Aus dem Institut für Veterinär-Pharmakologie
Abteilung für Experimentelle Therapie und Funktionelle Pathologie
der Veterinärmedizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin

Direktor: Prof. Dr. phil. Dr. med. vet. Dr. med. G. Schützler

---

VERSUCHE ZUR QUANTITATIVEN BESTIMMUNG VON ALBUMIN BEI DER AGARGELELEKTROPHORESE

INAUGURAL-DISSERTATION
zur
Erlangung des Grades eines Doktors der Veterinärmedizin
an der Freien Universität Berlin

vorgelegt
von
Werner Schulze
Tierarzt aus Frankenfelde/Luckenwalde

Berlin 1965

Journal-Nr.: 500

Aus dem Institut für Veterinär-Pharmakologie
Abteilung für Experimentelle Therapie und Funktionelle Pathologie
der Veterinärmedizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin

Direktor: Prof. Dr. phil. Dr. med. vet. Dr. med. G. Schützler

---

Versuche zur quantitativen Bestimmung von Albumin bei der Agargelelektrophorese

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung
des Grades eines Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Werner Schulze
Tierarzt aus Frankenfelde/Luckenwalde

Berlin 1965
Journal Nr. 500

Gedruckt mit Genehmigung der Veterinärmedizinischen Fakultät
der Freien Universität Berlin

Dekan: Prof. Dr. J. Boch
Referent: Prof. Dr. Dr. Dr. G. Schützler
Korreferent: Prof. Dr. Dr. K. Drepper

Tag der mündlichen Prüfung: 24. Februar 1965
Tag der Promotion: 2. August 1965

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

A. Einleitung 1

B. Literaturbesprechung 2

I. Die freie Grenzflächenelektrophorese 2

II. Die Zonenelektrophorese auf: 2
- a) Papier
- b) Celluloseazetat
- c) Stärkegel
- d) Polyacrylamid
- e) Agar

C. Eigene Untersuchungen 12

I. Methode 12
- a) Herstellung der Pherogramme
  - Anfertigung des Agars
  - Elektrophorese-Apparatur
  - Auftragen des Serums
  - Elektrophorese
  - Fixieren
  - Färben-Entfärben
  - Abdecken des Agarfilms
- b) Auswertung der Pherogramme
  - Spannungsstabilisator
  - Photometer
  - Angleichgerät
  - elektronisches Voltmeter
  - Schreibgerät
  - Integrator
  - Eichung
  - Einstellung der Geräte zur Messung der Pherogramme

II. Befunde und Auswertung 20
- a) Disc-Integrator - Planimeter, ein Methodenvergleich
  - Meß - Planimetrierfehler

Seite

b) Untersuchungen zur Methodik der Anfärbung der Pherogramme

Einfluß der Fixationszeit
Einfluß der Färbezeit

c) Albumin-Normalserumreihe
Statistische Auswertung der Ergebnisse

D. Diskussion 36

E. Zusammenfassung 42

F. Literaturverzeichnis 43

A B B I L D U N G S V E R Z E I C H N I S

Abb. 1 Auswertapparatur 17

Abb. 2 Eichung der Auswertapparatur 19

Abb. 3 Reproduzierbarkeit der Agargelelektrophorese 27

Abb. 4 Reinalbuminverdünnungsreihe (Planimetereinheiten) 28

Abb. 5 Reinalbuminverdünnungsreihe (Disc-Integratorwerte) 29

Abb. 6 Rinderserumalbuminverdünnungsreihe 31

Abb. 7 Varianzen und Standardabweichungen für die einzelnen Konzentrationen 34

A. Einleitung

Das Prinzip der Isolierung labiler Makromoleküle mit Hilfe ihrer Beweglichkeit im elektrischen Feld wurde bereits zu Beginn dieses Jahrhunderts von MICHAELIS (59) und FIELD und TEAGUE (24, 25) entdeckt. Breitere Anwendung fand die Methode jedoch erst, als es TISELIUS im Jahre 1937 mit Hilfe der freien Elektrophorese gelang, Gemische von Eiweißkörpern aufgrund ihrer unterschiedlichen Wanderungsgeschwindigkeit in ihrer Zusammensetzung exakt zu analysieren. Der apparative Aufwand dieser Methode ist allerdings so groß, daß ihrer Anwendung in der Klinik Grenzen gesetzt sind. Die Elektrophorese fand erst allgemeine Verbreitung, als mehrere Arbeitsgruppen in den Jahren 1950 und 1951 die Zonenelektrophorese unter Verwendung von Papier als Träger einführten und in den folgenden Jahren Apparaturen entwickelten, die eine einfache Auswertung der Ergebnisse gestatten. Zeichnet sich auch die Papierelektrophorese durch ein Mindestmaß an Substanzverbrauch und apparativem Aufwand aus, so weist doch Papier als Träger Nachteile auf, die den Anlaß gaben, nach neuen, besseren Trägersubstanzen zu suchen. Celluloseazetat und Stoffe mit Gelstruktur erwiesen sich aufgrund ihrer Transparenz bzw. der Fähigkeit, Seren in zahlreichere, scharf abgesetzte Fraktionen aufzutrennen, gegenüber dem Papier als Träger überlegen. Besondere Bedeutung erlangte unter diesen Substanzen Agar.
WIEME (102) gelang es, unter Anwendung hoher Feldstärken und Petroläther als Kühlmittel eine Methode der Kurzzeitelektrophorese zu entwickeln, die auf klarem Untergrund die Fraktionen deutlich und scharf abgegrenzt erscheinen läßt und damit die besten Voraussetzungen für einwandfreie photometrische Auswertung bietet. Über die quantitative Analyse der durch die Agarelektrophorese ernaltenen Pherogramme liegen keine befriedigenden Untersuchungsergebnisse vor, weil für diesen Zweck nur wenig geeignete Photometer zur Verfügung stehen.

In dieser Arbeit soll unter Anwendung einer für die quantitative Auswertung des Albumins zusammengestellten Photometerkombination die Frage geprüft werden, in welchen Konzentrationsbereichen lineare Beziehungen zwischen Extinktion und Konzentration bestehen. Als Modell wird in diesen Untersuchungen Reinalbumin (BEHRING) und Mischserum eines gesunden Rindes verwendet.

B. Literaturbesprechung

I. Die freie Grenzflächenelektrophorese

TISELIUS gelang es unter Anwendung eines modifizierten Nernstschen U-Rohres ein Verfahren zu entwickeln, das eine sichere Beobachtung der während des elektrophoretischen Vorganges sich bildenden Grenzflächen gestattet. Der Vorteil der freien Grenzflächenelektrophorese liegt vor allem darin, daß die elektrophoretische Wanderung in freier Lösung stattfindet und die quantitative Auswertung ohne Anfärbung vorgenommen werden kann. Wenn sich auch mehrere Autoren bemühten, die Technik dieses Verfahrens zu vereinfachen, so stand einer Anwendung der Methode auf praktisch-medizinischem Gebiet der verhältnismäßig große technische und komplizierte Aufwand im Wege (79).

II. Die Zonenelektrophorese auf:

a) Papier. Als klinisch-diagnostische Methode fand die Elektrophorese erst weite Verbreitung, als es GRASSMANN und HANNIG (35), DURRUM (17), CREMER und TISELIUS (13), WIELAND und WIRTH (101) und TURBA und ENENKEL (93) gelang, Papier als Träger einzuführen. Die bei der freien Elektrophorese infolge Konvektion auftretenden Störungen werden bei der Papierelektrophorese vermieden. Als Untersuchungsmaterial werden nur geringe Substanzmengen benötigt. Papier als Träger weist jedoch einige Nachteile auf.
LINKE (54) beschreibt das Papier als ein Geflecht ungleich starker Fasern, durch welches die elektro-

phoretische Wanderung der Eiweiße nicht gleichmäßig erfolgt. PEZOLD (66) betont, daß die Stärke und Textur des Papiers die Resultate der elektrophoretischen Trennung wesentlich beeinflussen. Auf die ungleichmäßige Farbstoffverteilung an den mit Eiweißen getränkten Zellulosefasern des Papiers weisen JENKS und Mitarb. (43) anhand von Mikroaufnahmen hin. Auf die an Papierfasern adsorbierten Proteine ist der von BUSSARD (10) beobachtete "tailing factor" zurückzuführen. Die auf der Wanderung liegenbleibenden Albumine weisen eine Größenordnung bis zu 10 % auf (10, 57).
Ein weiterer nachteiliger Faktor ist das Auftreten einer kathodenwärts reichenden "Schleppe", die auf verschiedene Papierqualitäten oder elektroosmotische Effekte zurückgeführt wird (83).

Neben der ungleichmäßigen Farbstoffverteilung im Papier, muß die für alle Trägermedien geltende unterschiedliche Anfärbbarkeit der einzelnen Fraktionen berücksichtigt werden (109). Weiterhin führen die verschiedenen Färbeverfahren, insbesondere die Verwendung verschiedener Farbstoffe, zu unterschiedlichen quantitativen Aussagen (27, 53, 89). Da die relative Anfärbbarkeit des Albumins größer als diejenige anderer Fraktionen ist, sind erhöhte Albuminwerte die Folge und verlangen die Anwendung eines Korrekturfaktors (50), worüber die Angaben voneinander abweichen (27, 15, 37, 41, 43, 47, 14, 51, 52, 68, 74, 40, 85, 96, 72, 53). Einige Autoren halten infolge der großen Variabilität der Korrekturangabe eine solche grundsätzlich bei der Papierelektrophorese nicht für möglich (47, 12, 13), andere erklären Korrekturfaktoren zum mindesten bei pathologischen Seren für unbrauchbar (12, 39, 47, 66).
Bei der Auswertung der Pherogramme der Papierelektrophorese wird der prozentuale Anteil der einzelnen Fraktionen ermittelt. Man bestimmt die Extinktionen des gesamten Streifens im Transparentverfahren. Hierbei erweist sich nach WIEME (103) und BUSSARD (10) die

unvollkommene Transparenz des Papiers als besonders nachteilig. Wenn auch die Mehrzahl der Autoren der Ansicht ist, daß das LAMBERT-BEERsche-Gesetz bei der Transparenzphotometrie erfüllt ist (36, 46), so behaupten DURRUM und KOLL (17), daß für die Lichtabsorption von Farbstoffen das Gesetz nicht gilt. Die Auswertung wird heute in der Regel mit vollautomatischen Geräten (Analytrol, Zeiss Extinktionsschreiber, Elphor Integraph) durchgeführt, deren Brauchbarkeit durch einige Autoren bestätigt wird (11, 56, 108, 71, 83, 46). Die Geräte arbeiten ausschließlich mit monochromatischem Licht, auf dessen Bedeutung mehrere Autoren (55, 67, 36) besonders hingewiesen haben. Die Umwandlung der Absorptions- in Extinktionswerte erfolgt über logarithmische Vergleichswertblenden. Bei der Auswertung wird die oben erwähnte unterschiedliche Anfärbbarkeit zwischen Albuminen und Globulinen nicht berücksichtigt. Nach GRASSMANN und HANNIG (35) liegen die Globulinwerte in Bereichen niederer Extinktion, in denen die Beziehung zwischen Proteindichte und Extinktion nahezu linear sind. Infolge ihrer stärkeren Anfärbbarkeit und ihrer pro mm^2 Papier erhöhten Konzentration liegen die Albuminwerte in einem Bereich, in dem das Licht die Farbdichte nicht zu durchdringen vermag und die Extinktionskurve abflacht, dadurch sind die abgelesenen Albuminwerte erniedrigt und so der Fehler kompensiert, der sich aus ihrem höheren Farbstoffbindungsvermögen ergibt. Bei pathologischen Seren liegen besondere Verhältnisse vor (105). Die Frage der Beziehung zwischen Farbstoffbindung und Proteinmenge unter besonderer Berücksichtigung der Verteilung auf dem Träger, wird von SIMON (89) untersucht. Er stellt fest, daß eine Linearität zwischen Eiweißmenge und Farbsättigung unterhalb von 10 γ /cm^2 für Amidoschwarz liegt.

Aus der zahlreichen Literatur über die Papierelektrophorese - RIBEIRO und Mitarb. (78) geben allein bis 1956 2500 Literaturstellen an - und aus den obigen Betrachtungen ergibt sich, daß über die Anwendung der

Papierelektrophorese als quantitatives Verfahren recht unterschiedliche Ansichten bestehen. Von NAUMANN und Mitarb. (61) wird der Fehler der Methode mit ± 10 bis ± 20 % angegeben. TISELIUS (92) bezeichnet das Verfahren der Papierelektrophorese als ein halb-quantitatives.

Vergleiche der Papierelektrophorese mit der freien Grenzflächenelektrophorese ergaben unterschiedliche Ergebnisse. Nach ESSER und Mitarb. (18) differieren die Albuminwerte um ± 5 %, die Globulinwerte um ± 10 %. GRASSMANN und HANNIG (35) erklären die bei der Papierelektrophorese als zu niedrig bestimmten Werte für die β -Globuline durch die Tatsache, daß diese Fraktion zu einem wesentlichen Teil aus einem Lipoproteid besteht, dessen Lipoidkomponente zwar bei der Bestimmung des Brechungsgradienten nach TISELIUS, sicher aber nicht bei der kolorimetrischen Methode aufgrund ihrer unterschiedlichen Anfärbbarkeit erfaßt wird (56).
PEZOLD (66) hält einen Vergleich von freier und Papierelektrophorese für nicht möglich, da bei der TISELIUS-Methode eine Auftrennung von Komponentensummen, bei der Papierelektrophorese eine Auftrennung in "reine Fraktionen erfolgt".

Eine Kontrolle des durch die Papierelektrophorese ermittelten Verhältnisses zwischen Albuminen und Globulinen mit Hilfe des KEYSERschen Verfahrens (45) ist umstritten, da nach CROWLEY (15) und BRAECKEN und KLOTZ (7) die Farbbindung der Methylorange nicht spezifisch für das Albumin ist, sondern durch die Konzentration von α- und β -Globulinen im Serum beeinflußt wird. Aus diesem Grunde lassen sich die guten Korrelationen, die man bei normalen Seren erhält, nicht auf pathologische Seren ausdehnen. Während KEYSER und GOODWIN (45, 31) eine Übereinstimmung zwischen der Farbbindungsmethode und der Papierelektrophorese (Transparenzverfahren) fanden, stellten WATSON und NANKIVILLE (97) Abweichungen der Albuminwerte von 1-2 g % fest. PHILPOT (70) erklärt diese Differenz mit der unterschiedlichen Anfärbbarkeit

verschiedener Standardalbumine. Auf die Beeinflussung der Methylorange-Methode durch die Temperatur weist FAILING und Mitarb. (19) hin. Die gleichen Autoren erhielten bei Benutzung verschiedener Chargen des Farbstoffes unterschiedliche Eichkurven.

Von einigen Autoren wird die Elution der durch Papierelektrophorese erhaltenen Pherogramme als Auswertverfahren vorgeschlagen. Diesem ursprünglich von CREMER-TISELIUS (13) und TURBA-ENENKEL (93) angewendeten Verfahren müßte nach PEZOLD (66) vom theoretischen Standpunkt aus der Vorzug gegeben werden. Nach WUNDERLY (105) hat eine Reihe von Nachprüfungen (JENKS, SCHULZ) ergeben, daß die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse mit der Elutionstechnik etwas genauer ist als mit der Transparenzphotometrie (2, 60, 46, 64, 67, 87, 96, 99). Es muß jedoch hervorgehoben werden, daß nach JENKS (43), HENRY (41) und SCHULZ (87) das Konzentrations-Extinktionsverhältnis nur im Bereich der Globuline, also der niedrigen Extinktionen, sowohl bei der Transparenzphotometrie als auch bei Elution linear ist. Im Bereich der Albumine besteht eine solche Linearität nicht. SCHULZ und HOLDCRAFT (87) führen dieses Phänomen auf eine nichtlineare Adsorption des Farbstoffes an die im Bereich der Albumine dicht gelagerten Proteine zurück. Vom Standpunkt der Praxis aus lehnt PEZOLD (66) die Elution ab, da besonders bei pathologischen Seren die Fraktionsgrenzen schwer festzulegen sind.

b) Celluloseazetat. Papier als Träger weist vor allem den Nachteil der Adsorption, der ungenügenden Transparenz und der ungleichmäßigen Textur auf. Im letzten Jahrzehnt wurden neue, bessere Träger wie Celluloseazetat und Stoffe mit Gelstruktur erprobt. Über die günstigen Eigenschaften der Celluloseazetatmembran, die für die Technik der Immundiffusion, Immunelektrophorese und der Mikroelektrophorese Verwendung finden kann, berichten KOHN (48, 49, 50), FRIEDMAN (29), BRACKENRIDGE (8), BRACKENRIDGE mit COLLAG (9) und SALMONS (81).

Die Celluloseazetatfolie ist in ihrer Struktur homogen, wobei der schaumförmige Aufbau mit relativ gleichförmigen Porenweiten den Durchgang der großen Moleküle erleichtert.

Infolge der geringeren Anwesenheit freier Hydroxylgruppen ist die Adsorption der Proteine minimal; es fehlt daher die bei der Papierelektrophorese der Serumeiweißkörper bekannte Albuminschleppe (50, 38).
Die Celluloseazetatmembran läßt sich durch Behandlung mit Öl (Whitmore Oil 120) oder Methyläthylketon und Dioxan (Verhältnis 3:2) vollkommen transparent machen. Ein anderes Verfahren ist das Besprühen mit Eisessig, hierdurch schwinden die Poren und es wird eine durchsichtige Folie erzielt (50). Hervorzuheben ist die Tatsache, daß dieses Trägermaterial in bestimmten Lösungsmittel-Kompositionen löslich ist, die getrennten Banden können also herausgeschnitten, in geeigneten Lösungsmitteln gelöst und kolorimetrisch ausgewertet werden.

KOHN (48, 50) und GRUNBAUM (38) berichten ferner, daß die Banden auf dem Celluloseazetat-Elektrophoresestreifen sich schärfer als beim Papier abzeichnen.

Als Nachteil dieses Trägers ist zu erwähnen, daß bei der von KOHN verwendeten Apparatur die Evaporation stärker als beim Agar ist, und daß die Fraktionen wesentlich verschwommener gegenüber der Agarelektrophorese in der Technik nach WIEME (102) erscheinen.

c) <u>Stärkegel</u>. Für die Stärkegelelektrophorese verwendet man ein Gel, das man nach dem Verfahren von SMITHIES (90) durch Erwärmen hydrolisierter Stärke mit Boratpuffer erhält. Die Wanderungsgeschwindigkeit der Proteine auf diesem Träger ist nicht allein von ihrer Ladung, sondern auch von ihrer Molekülgröße abhängig. Hämoglobin wandert mit seiner kleineren Molekülgröße schneller als das β-Globulin, obwohl die Ladung beider Proteine unter den gleichen Pufferbedingungen identisch ist. Die Porengröße des Stärkegels liegt in der Größenordnung der biologisch wichtigsten Makromoleküle. -

Die Auftrennungsfähigkeit der Stärkegelelektrophorese beruht zu einem wesentlichen Teil auf dem Siebeffekt des Trägermediums. SMITHIES und POULIK (91) gelang es, mit der zweidimensionalen Stärkegelelektrophorese 20 Komponenten eines Humanserums nachzuweisen. Allerdings stimmt die Sequenz der Fraktionen nicht mit der klassischen Elektrophorese überein. Ihre Zuordnung und Nomenklatur, besonders in pathologischen Fällen, bereitet Schwierigkeiten. Nicht alle Proteine werden durch die Stärkegelelektrophorese erfaßt. POULIK (73), SILBERMAN (88) und OLIVER mit RUBINSTEIN (62) stellten fest, daß die Porengröße des Stärkegels die Wanderung der besonders unter pathologischen Bedingungen auftretenden Makroglobuline verhindert.

Stärkegel wird in einer 6 - 8 mm starken Schicht verwendet. Bei dieser Schichtdicke entsteht durch Wärmeentwicklung eine deutliche Verzerrung der Pherogramme.

PALETTA (65) modifiziert die von SMITHIES (90) angegebene Versuchsanordnung, indem er für gleichmäßige Wärmeableitung durch beidseitige Kühlung des Gels der Elektrophorese sorgt. Trotz dieser Einrichtung treten Querschnittsverzerrungen der gewanderten Proteine auf. Zur quantitativen Auswertung wird es notwendig, das von VAHVASELKÄ (94) vorgeschlagene Verfahren anzuwenden, bei welchem mit einer Schneidevorrichtung aus dem 6 - 8 mm starken Gel eine 1 mm-Schicht waagerecht herausgetrennt wird. Dieses Verfahren ist sehr zeitraubend.

Zur Vermeidung des Auftretens von Temperaturgradienten und zur Vereinfachung der Auswertungstechnik entwickelte BAUR (4) eine Methode der Dünnschicht-Stärke-Elektrophorese-. Wird bei diesem Verfahren die Auswerttechnik vereinfacht, so erfordert es doch einen erheblichen Aufwand bei der vom Autor vorgeschlagenen Präparation der 1 mm dicken Trägerschicht.

Zur quantitativen Auswertung ist es erforderlich, die Transparenz des an sich trüben Stärkegels zu erhöhen. Verfahren hierfür sind von RUBINSTEIN und Mitarb., BAUR und FINE (80, 4, 26) angegeben.

d) Polyacrylamid. Polyacrylamid ist ein synthetisches Gel, welches durch Polymerisation von Acrylamid mit N, N-Methylen-Biacrylamid innerhalb kurzer Zeit entsteht, wenn die Vernetzung mit Ammoniumsulfat mit dem Katalysator Dimethylaminopropionitrit in Gang gesetzt wird (22). Durch Variieren der Konzentration läßt sich die "Maschenweite" des Gels verschieden einstellen (OTT (63), RAYMOND und WEINTRAUB (77), RAYMOND und WANG (76)). Die Herstellung des Gels erfolgt mit den üblichen Puffern. FERRIS und EASTERLING (22, 23) erprobten verschiedene Puffer und konnten 12 bis 16 Fraktionen nachweisen. Wie im Stärkegel sind auch im Acrylamidgel die klassischen Komponenten verschoben.

Die Färbung und Entfärbung der auf Acrylamidelektrophorese gewonnenen Pherogramme erfordern 16 bzw. 5 Stunden (20). Zur Verkürzung der Auswaschungszeit wird von FERRIS (21) ein Verfahren vorgeschlagen, bei welchem die Entfärbung im elektrischen Feld erfolgt. Bei der von FERRIS (23) angewendeten Technik ist die Trägerschicht 4,5 mm stark.

e) Agar. Agar, ein aus Algen extrahiertes Polysaccharid, wurde von KENDALL (44) erstmalig im Jahre 1923 für die Elektrophorese zur Trennung von Alkaloiden verwendet. Erst 20 Jahre später wurde Agargel zur Eiweißelektrophorese von zahlreichen Autoren wie GORDON-REICHARD (32), GORDON und Mitarb. (33), GRABAR-WILLIAMS (34), SCHEIDEGGER (82), BUSSARD-PERRIN (10), WUNDERLY (106), WUNDERLY-BUSTAMANTE (107), GIRI (30), BENNET (5), WIEME-RABACY (104), JANSEN (42) und PEZOLD-THOMAS (69) angegeben. WIEME (102) gelang es, die Technik der Agarelektrophorese so zu vervollkommnen, daß ihre Anwendung auch unter klinischen Verhältnissen möglich ist.

Agargel stellt ein Geflecht von netzartig verknüpften Molekülen dar. In einer Konzentration von 2 % beträgt die Maschenweite etwa 30 - 60 Å (103), eine Größe, die den Durchtritt auch von Makromolekülen gestattet. Nach WIEME (102) ist die Auftrennung der Proteine zum Teil auf die selektive Filterwirkung des Agars zurückzuführen. Die Form der Proteinmoleküle hat hierbei einen größeren Einfluß als das Molekulargewicht. Fibrinogen, das als asymmetrisches Molekül ein Achsenverhältnis von 700/38 und ein Molekulargewicht von 400 000 (86) aufweist, wird durch den Siebeffekt in seiner Wanderung gehemmt. Für diese Ansicht spricht, daß bei einer niedrigeren Agarkonzentration von 0,75 % eine Wanderung des Fibrinogens erfolgt (BOCKEMÜLLER und OERTER (6)). Diese Autoren stellten fest, daß hochmolekulare Sphärokolloide aufgrund ihrer Kugelform das Gel durchdringen, während vernetzte Fadenmoleküle vom Typ der hochmolekularen DNS durch die Netzstruktur des Agars zurückgehalten werden. WIEME (102) hält es jedoch nicht für ausgeschlossen, daß die Hemmung der Wanderung des Proteins auf eine Präzipitation infolge der Verunreinigung des Agars mit Sulfatgruppen zurückzuführen ist. Er vermutet auch, daß das Liegenbleiben der β-Lipoproteide seine Ursache in der Präzipitation hat.

Zur Reinigung des Agars von den Sulfatgruppen und anderen Verunreinigungen wurden verschiedene Verfahren ausgearbeitet, die in der Monographie von WIEME näher beschrieben sind. WIEME (102) verwendete nur kommerziell erhältliche Agarsorten und erzielte die besten Ergebnisse mit dem Difco Spezial Agar Noble.

Infolge der Elektroosmose, die beim Agargel wesentlich höher als beim Papier ist, werden die β- und γ-Globuline zur Kathode getragen, während die α-Globuline und das Albumin stets anodenwärts wandern (3).
Die Elektroosmose ist auf die elektrische Ladung des Gels zurückzuführen. Nach WIEME (102) sind hierfür die mit den Polysacchariden verbundenen Sulfatgruppen verantwortlich.

Bei der von WIEME (102) entwickelten Technik werden die Agarstreifen als Brücke zwischen zwei aus Gelblöcken bestehenden Elektroden gelegt und auf diese Weise der elektroosmotische Fluß vollkommen gleichmäßig gehalten. Eine Adsorption der Proteine tritt im Gegensatz zum Papier nicht oder in einem zu vernachlässigendem Umfange auf (110). Der Autor hält den störenden Einfluß der Diffusion durch Anwendung hoher Feldstärken und Einhaltung eines kurzen elektrischen Feldes unter Verwendung von Petroläther als Kühlmittel in engen Grenzen.

Das Agargel als Träger eignet sich besonders zur quantitativen Auswertung, weil es auch nach dem Trocknen vollkommen homogen und bis zum kurzwelligen Ultraviolett transparent ist (75). Die Auswertung der Agarpherogramme bereitet besonders hinsichtlich der Bestimmung des Albumin-Globulin-Verhältnisses Schwierigkeiten. WIEME (102) fand nach Anfärbung mit Amidoschwarz 10 B für Humanalbumin überhöhte Werte, so daß nur das prozentuale Verhältnis der Globuline untereinander bestimmt werden kann. Er stellt fest, daß bei zunehmenden Konzentrationen die optische Dichte dem Lambert-Beer'schen Gesetz nicht mehr folgt. Die Extinktionen steigen steiler an als die wachsenden Konzentrationen.

WIEME (102) verwendete für seine Untersuchungen das Eppendorf-Gerät, das für die Densitometrie der Agarpherogramme wenig geeignet ist, da die Vorbeiführung an der Photozelle über einen Handbetrieb erfolgt und jeder Wert auf der Skala abgelesen werden muß.

C. Eigene Untersuchungen

I. Methode

a) Herstellung der Pherogramme

Anfertigung des Agars. Nach dem Vorschlag von WIEME (102) verwendeten wir den auch nach der Untersuchung von FRICKE (28) bewährten Difco-Special Agar Noble[+)] und den von beiden Autoren angegebenen Veronalpuffer. Dieser besteht aus:

Barbital-Natrium (Natrium 5,5 diaethylbarbituricum Merck)		17,0 g
HCl 0,1 n		235,0 ml
Aq.dest.	ad	1000,0 ml
pH 8,4 μ 0,1		

Zu 1000 ml siedendem Veronalpuffer, der mit gleichen Teilen Aq.dest. verdünnt wurde, werden 9 g Difco-Special Agar Noble und 100 mg Merthiolat (Thiomersal rein, Schuchardt, München) zugegeben. Merthiolat dient der Verhinderung des Bakterienwachstums im Agar. Der Erlenmeyerkolben muß 20 Minuten im kochenden Wasserbad verbleiben, bis die Agarlösung klar durchsichtig ist. Die auf diese Weise hergestellte Agarlösung wird bei 50°C in Petrischalen pipettiert, so daß eine waagerechte dünne Agarschicht entsteht. Auf die erstarrte Agarschicht werden in jede einzelne Petrischale 4 Objektträger (26 x 76 x 1 mm) verteilt, die mit 35 ml Agarlösung übergossen werden. Jeder Objektträger erhält damit eine gleichmäßige Agarschicht von 0,17 cm Stärke. Nachdem die Deckschicht erstarrt ist, werden die Petrischalen kühl aufbewahrt und sind gebrauchsfertig.

Elektrophorese-Apparatur. Die Elektrophorese wurde mit dem von der Firma Vitatron, Amsterdam, hergestellten Agar-Elektrophoresegerät EVA/CT vorgenommen. Diese Apparatur besteht aus einer Elektrophoresekammer und einem elektronischen Stabilisator, in den eine Membranpumpe eingebaut ist. Mit dem Stabilisator können wahlweise Strom oder Spannung konstant gehalten werden.

+) Difco Laboratories, Michigan

Die Elektrophoresekammer ist so eingerichtet, daß die Objektträger mit ihrer Agarschicht auf die aus Agar bestehenden Elektroden gelagert werden. Die Elektroden und Objektträger in der eigentlichen Elektrophoresekammer sind mit Petroläther umgeben. Dieser wird bei Temperaturanstieg durch die Membranpumpe mit Luft durchperlt; die sich dabei entwickelnde Verdampfungskälte senkt die Temperatur. Die Membranpumpe wird über die Spannung gesteuert. Sinkt die Spannung bei Temperaturanstieg, so schaltet sich die Membranpumpe ein.

Auftragen des Serums. Der Objektträger wird nach Umschneiden des Agars aus der Petrischale auf eine schwarze Schablone gelegt. Mit einer kleinen Pinzette werden in das Gel drei 4 x 7 mm große Filterpapierstreifen mit ihrer Schmalseite in Höhe der auf der Schablone markierten Startlinie eingesetzt. Wenn sich die Papierstreifen mit Puffer vollgesaugt haben, werden sie vorsichtig senkrecht nach oben herausgezogen und unmittelbar danach 1,63 µl Serum in den entstandenen kleinen Trog mit Hilfe einer Mikropipette eingefüllt. Diese ist nach dem Verfahren von MATTENHEIMER (58) geeicht und besteht aus dem feinen, an seiner Spitze ausgezogenen PVC-Schlauch, dem gläsernen Verbindungsstück und einem 30 cm langen Ventilschlauch, der mit einem Mundstück versehen ist.

Elektrophorese. Zur Elektrophorese wird in die Puffertröge, die mit den Agarelektrodenblöcken in Verbindung stehen, der bereits in dem Abschnitt "Herstellung des Agars" angegebene Veronalpuffer eingefüllt, die Trägerkammer sodann mit Petroläther versehen und die mit Gel beschichteten Objektträger so auf die Agarelektroden gelegt, daß Gel auf Gel gelangt. Wird eine Spannung von 200 bis 210 V angelegt, so liegt die Stromstärke bei gleichzeitiger Verwendung von drei Objektträgern zwischen 25 und 30 mA je Träger. Der Elektrophoresevorgang dauert unter diesen Verhältnissen bei Einhaltung einer Temperatur zwischen 8 und 10°C 25 Minuten.

Fixieren. Sofort nach beendeter Elektrophorese werden die Agarplatten 30 Minuten in eine Fixationslösung gelegt. Sie besteht aus:

96%-igem Alkohol	70 ml
Eisessig	5 ml
Aq.dest.	25 ml

Die fixierte Agarplatte wird mit einem 4 x 9 cm großen Streifen Machery & Nagel-Papier, das eine besonders glatte, faserfeste Oberfläche aufweist, abgedeckt. Der Objektträger wird dann mit der Agarseite nach oben über Nacht getrocknet.

Färben und Entfärben. Vor der Färbung werden die Papierstreifen von der zur dünnen Folie fest am Objektträger angetrockneten Agarschicht abgezogen und anschließend in einer Amidoschwarzlösung gefärbt, die sich wie folgt zusammensetzt:

Amidoschwarz 10 B	0,5 g
Quecksilber-II-chlorid (Merck)	5,0 g
Eisessig	5,0 ml
Aq.dest.	ad 100,0 ml

Die Agarplatten werden zweimal 5 Minuten in 2% Eisessiglösung entfärbt. Die Agarseite der Objektträger wird kurz mit Filterpapier abgetupft und bei Zimmertemperatur getrocknet.

Abdecken des Agarfilms. Eine Auswahl der für die Auswertung geeigneten Pherogramme ist erst nach der Färbung möglich, da jetzt die Eiweißfraktionen gut zu erkennen sind. Objektträger mit schief gelaufenem und wellenförmigem Band, waagerechten Streifen und unscharfer Trennung werden aussortiert. Die zur Auswertung vorgesehenen Objektträger werden mit Xylol gewaschen. Die Abdeckung erfolgt mit 1 ml Diatex+), das in einem Verhältnis 1:3 mit Xylol verdünnt wird. Zur Aufbringung des Lackes hat sich ein Honigspender bewährt. Die Träger müssen während der 12-stündigen Trockenzeit staubfrei gelagert werden.

+) Allan Svenson, Malmö

b) Auswertung der Pherogramme

Die Auswertungsapparatur ist aus folgenden Einzelgeräten zusammengestellt (Abb. 1):

Spannungsstabilisator
Universal-Photometer
Angleichgerät
elektronisches log. Voltmeter
Schreibgerät mit Integrator.

Der Einsatz des Spannungsstabilisators (Fa. Philips Typ PE 4222) wurde notwendig, da sich infolge von Netzschwankungen bei der Auswertung der Pherogramme Fehler ergaben, die zwischen 3 und 5 % lagen.

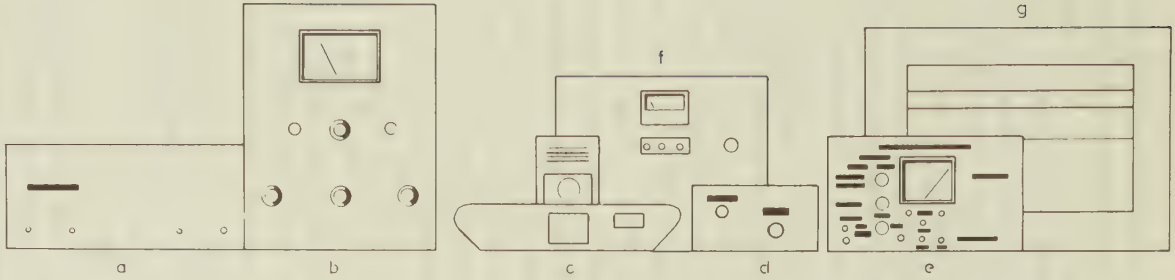
Als Photometer verwendeten wir das Gerät UFD 100 der Firma Vitatron. Der Vorteil dieses preiswerten und zweckmäßigen Gerätes liegt in der Trennung der optischen von der elektronischen Einheit. Die optische Einheit kann durch Austausch von Einzelteilen sowohl zur Kolorimetrie als auch zur Densitometrie eingesetzt werden. Bei dem letzteren Verfahren bewegt ein Transportband die Pherogramme über die 0,1 x 2,3 mm breite Schlitzblende, unter welcher der Photomultiplier angeordnet ist. Die Pherogramme werden mit monochromatischem Licht ausgeleuchtet, das mit einer Hg-Lampe unter Anwendung von Interferenzfiltern (482 nm, 559 nm, 606 nm) erzeugt wird.

Mit Hilfe des Angleichgerätes wird die Photometerspannung von 1 - 3 V auf 5 mV herabgesetzt. Diese Spannung wird mit einem zu diesem Zweck konstruierten elektronischen Voltmeter logarithmisch umgesetzt. Seine Bereichseinstellung beträgt 20 - 60 DB. Die Herstellung des Gerätes erfolgte durch Ingenieure der Technischen Universität Berlin.

Als Schreibgerät dient ein Kompensationsschreiber der Firma Honeywell (Modell Y 153 x 18). Seine Transporteinrichtung wurde so umkonstruiert, daß eine Schreibgeschwindigkeit von 17,2 mm/Min. erreicht werden kann. Zur automatischen Integration während des Schreibvorganges ist ein Integrator der Firma Disc. (Modell 201) in das Schreibgerät eingebaut.

Da uns die ursprüngliche, von der Firma Vitatron hergestellte Gerätekombination wegen zu großer Ungenauigkeit nicht geeignet erschien, wurde von dieser Firma lediglich die Photometereinrichtung verwendet.

AUSWERTAPPARATUR



a STABILISATOR
b PHOTOMETER
c TRANSPORTBAND
d ANGLEICHGERAT
e LOGARITHM VOLTMETER
f ELEKTRON STABILISATOR
g SCHREIBGERAT

ABB.1

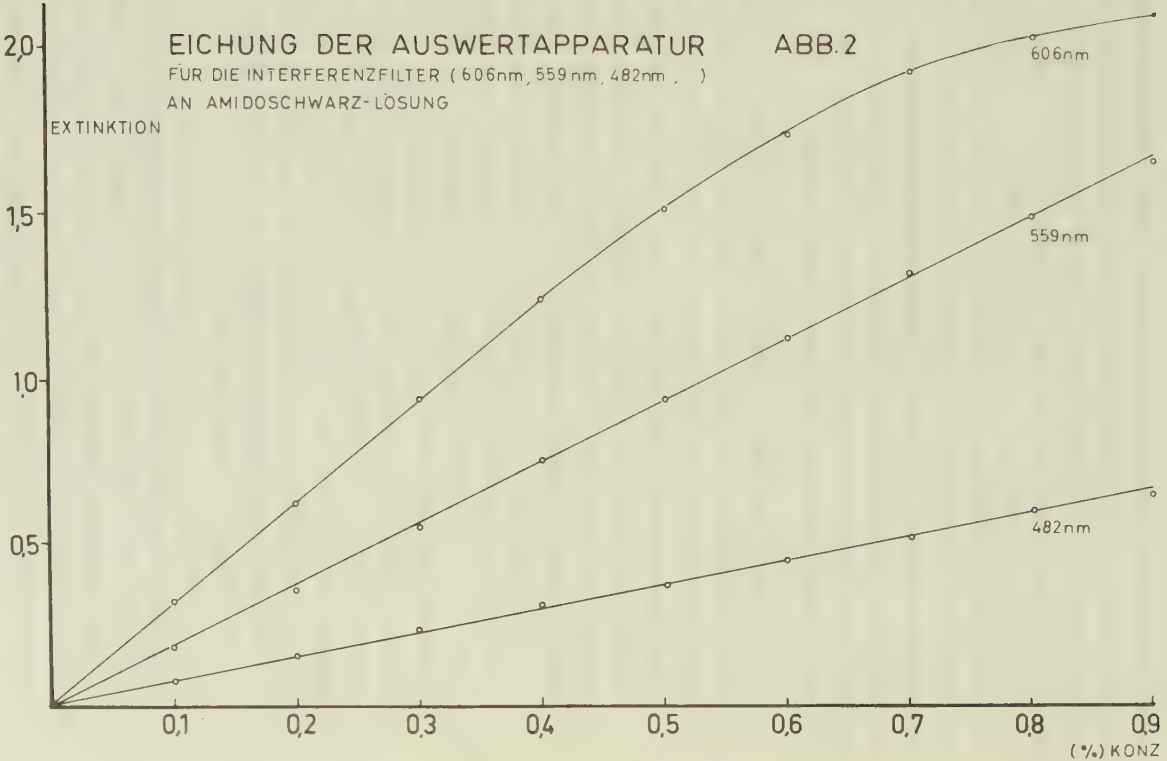
Eichung. Zur Überprüfung der Meßgenauigkeit der oben angegebenen Gerätekombination wurden, nach Ersatz des Transportbandes durch die Kolorimetereinrichtung, unter Verwendung verschiedener Filter, Eichkurven von Amidoschwarzlösungen aufgestellt und die Extinktionswerte sowohl direkt am Photometer als auch am Schreiber abgelesen. Die Werte zeigten eine weitgehende Übereinstimmung beider Ablesungsmethoden. Auf Abb. 2 sind die unter Anwendung der verschiedenen Interferenzfilter erhaltenen Eichkurven angegeben.

Einstellung der Geräte zur Messung der Pherogramme. Zunächst wird die Photometereinrichtung auf eine Durchlässigkeit von 100 % geeicht. Dies geschieht bei Verwendung des Filters 482 nur durch Verstellen der Spaltbreite, bei den Filtern 559 und 606 durch eine zusätzliche Erhöhung der Spannung des Photomultipliers. Die Eichung wird sowohl nach dem Amperemeter des Photometers als auch nach der Schreiberskala durchgeführt. Eventuelle Abweichungen des Schreibers von 100 % Transmission können durch Feinregulierung mit Hilfe eines Helipot-Drehpotentiometers am logarithmischen Voltmeter ausgeglichen werden.

Sodann wird der Spalt geschlossen und die Transmission von 0 zunächst am Photometer mit der Verstärkerfeinregulierung einjustiert. Anschließend wird die Korrektur der 0-Transmission am Schreiber mit Hilfe des Drehpotentiometers am Angleichgerät vorgenommen.

Die Photometereinrichtung ist nun schreibbereit. Das Pherogramm wird so auf das Transportband gelegt, daß die Mitte seiner Längsachse sich mit der Mitte der Schlitzblende deckt.

Neben der Ermittlung der Kurvenflächen mit dem Disc. Integrator wurde auch die Integration mit Hilfe eines Planimeters durchgeführt. Hierfür kam das Aristo Planimeter 1148 L zur Anwendung.


EICHUNG DER AUSWERTAPPARATUR
ABB. 2
FÜR DIE INTERFERENZFILTER (606nm, 559nm, 482nm,)
AN AMIDOSCHWARZ-LÖSUNG
EXTINKTION
2,0
1,5
1,0
0,5
606nm
559nm
482nm
0,1
0,2
0,3
0,4
0,5
0,6
0,7
0,8
0,9
(%) KONZ

II. Befunde und Auswertung

Die quantitative Auswertung der nach dem Verfahren von WIEME erhaltenen Pherogramme bereitet besonders hinsichtlich der Erfassung des Albumins Schwierigkeiten. Im folgenden Abschnitt der Arbeit soll über Untersuchungsergebnisse der quantitativen Auswertung berichtet werden. Im ersten Teil sind die Ergebnisse der Untersuchungen über die Methodik dargestellt. Im zweiten Teil dieses Abschnittes soll über die quantitativen Auswertungsergebnisse von insgesamt 2450 Pherogrammen, die durch Agargelelektrophorese von Rinderreinalbumin (BEHRING) und Albumin eines Rindermischserums erhalten wurden, berichtet werden. Vorversuche wurden an verschiedenen Hundeseren durchgeführt.

a) Disc. Integrator - Planimeter, ein Methodenvergleich

Das einfachste und schnellste Integrationsverfahren der Elektrophoresediagramme stellt zweifellos die Anwendung von Integratoren dar, welche direkt mit dem Registriergerät verbunden sind und die Integration während des Schreibens automatisch vornehmen. Zeitraubender ist das Planimetrieren der Kurven. In der Absicht, das sichere Verfahren, ohne Berücksichtigung eines eventuellen Mehraufwandes an Zeit, für die Auswertung anzuwenden, wurden beide Methoden vergleichend geprüft. Hierfür war es notwendig, einen Vergleichsmaßstab zu finden. Nach der Bedienungsanleitung des Planimeters entsprechen 5 Planimetereinheiten 1 cm^2. Der Umrechnungsfaktor von Disc. Integratoreinheiten auf cm^2 mußte aus Erfahrungswerten errechnet werden. Er beträgt bei einer Schreibgeschwindigkeit von 17,2 mm/Min. 10,17 Integratoreinheiten/cm^2.

Bei der Gegenüberstellung beider Auswertmethoden wurde die Hypothese aufgestellt, daß beide Verfahren zu den gleichen Ergebnissen führen, d.h. keine wesentlichen (signifikanten) Differenzen zwischen den Werten auftreten. Als Prüfverfahren wurde hierfür der Mittelwertvergleich bei paarweiser Zuordnung der Einzelwerte (WEBER (98), S. 154-156) herangezogen.

Tab. 1: Werte-Tabelle aus den Mittelwerten der Konzentrationsreihen.

Konzentration (%)	Integrator-werte (cm^2)	Planimeter-Einheiten (cm^2)	d_i	d_i^2
15,00	6,70	6,37	+0,33	0,1089
16,25	6,89	6,77	+0,12	0,0144
17,50	7,30	7,18	+0,12	0,0144
18,75	7,86	7,72	+0,14	0,0196
20,00	9,32	8,98	+0,34	0,1156
21,25	10,35	10,07	+0,28	0,0784
22,50	11,53	11,52	+0,01	0,0001
23,75	12,14	11,85	+0,29	0,0841
25,00	12,75	12,65	+0,10	0,0100
26,25	13,71	13,65	+0,06	0,0036
27,50	14,26	14,30	-0,04	0,0016
28,75	16,08	15,70	+0,38	0,1444
30,00	16,72	16,83	-0,11	0,0121
31,25	17,64	17,62	+0,02	0,0004
32,50	19,12	19,03	+0,09	0,0081
33,75	19,73	19,73	0	0
35,00	20,37	20,22	+0,15	0,0225
36,25	21,28	21,23	+0,05	0,0025
37,50	22,39	22,33	+0,06	0,0036
38,75	23,07	22,92	+0,15	0,0225
40,00	23,47	23,37	+0,10	0,0100
			$\Sigma 2,64$	$\Sigma 0,0708$

$\bar{d}$ 0,1257

$$t = \frac{\bar{d}}{s_d} \cdot \sqrt{n} = 4,39 > t_{0,01;20} = 2,85$$

Der sich bei den untersuchten Konzentrationen aufgrund von Mittelwerten aus je 12 Einzelbestimmungen ergebende empirische Prüfpunkt ($t = \frac{d}{s_d}\sqrt{n}$) hat eine wesentlich kleinere Wahrscheinlichkeit als die in der biologischen Statistik vorgegebene Irrtumswahrscheinlichkeit von 1 %. Somit muß die Hypothese auf Gleichheit beider Auswertverfahren verworfen werden. Um nun dem besseren Verfahren den Vorzug zu geben, wurden für beide Methoden bei den untersuchten Konzentrationen die mittleren quadratischen Abweichungen berechnet. Dabei zeigte sich, daß im Mittel der Schätzwert für den quadratischen methodischen Fehler (s^2) bei der Integration größer als beim Planimeter ist. Vor allem bei den unteren Konzentrationen ist die Integriermethode der Planimetriermethode in Bezug auf Genauigkeit deutlich unterlegen.

Meß-Planimetrierfehler. Eine Analyse des Gesamtfehlers bei der Auswertung von Pherogrammen ist bei der Anwendung des Disc. Integrators nicht möglich, da der Integrierfehler sich nicht von Fehlern trennen läßt, die beim Meßvorgang entstehen (z.B. das Pherogramm läuft nicht mit seiner Mittelachse über die Schlitzblende). Dagegen ist eine Streuungszerlegung bei der Anwendung des Planimeters möglich. Dadurch läßt sich der durch das Planimetrieren bedingte Fehler von den übrigen beim Meßvorgang auftretenden Fehlern trennen und für beide unabhängige Varianzen berechnen. Auf diese Varianzanalyse - Entwicklung der Varianzanalyse siehe WEBER (98), S. 165-185 - soll im folgenden eingegangen werden.
Es wurde z.B. bei der Konzentration von 15% = 0,6 g% eine Varianzanalyse durchgeführt. Dazu wurde ein Pherogramm mit Reinalbumin 6 mal hintereinander geschrieben. Jede Gaußkurve wurde 6 mal planimetriert, so daß 36 einzelne Planimetereinheiten vorlagen.
Bei der Konzentration von 15% (0,6 g%) ergaben sich folgende Berechnungen:

Tab. 2: Varianzanalyse

Kurve \ Pl.E.	1	2	3	4	5	6
1	35	35	35	35	36	36
2	37	37	36	36	38	37
3	36	37	36	37	36	36
4	37	36	36	35	35	35
5	36	37	37	37	37	37
6	35	36	35	36	35	35

Zur Vereinfachung der Berechnung wurde von jedem Planimeterwert die Zahl 35 subtrahiert.

Kurve \ Pl.E.	(x_i-35) 1	2	3	4	5	6	s_i	x_i^2	s_i^2
1	0	0	0	0	1	1	2	2	4
2	2	2	1	1	3	2	11	23	121
3)	1	2	1	2	1	1	8	12	64
4	2	1	1	0	0	0	4	6	16
5	1	2	2	2	2	2	11	21	121
6	0	1	0	1	0	0	2	2	4
							Σ38	Σ66	Σ330

Pl.E. = Planimetereinheiten

$$\Sigma x_i^2{}_j = 66$$

$$\frac{(\Sigma x_{ij})^2}{n} = 40,11$$

$$SA_1 = 66 - 40,11 = 25,89$$

$$\sum \frac{s_i^2}{n} = 55$$

$$SA_2 = 55 - 40,11 = 14,89$$

Tab. 3: Tafel der Varianzanalyse

Variabilität	Summe der Abweichungsquadrate (SA_x)	Freiheitsgrade (FG)	(M_x)
Gesamt	25,89	35	-
Zw.den Gruppen	14,89	5	2,98
Innerhalb der Gruppen	11,00	30	0,37 → σ_o^2

$\hat{\sigma}_o$ = 0,608 Pl.E. oder $\hat{\sigma}_o$ = 0,122 cm^2

Schätzung der Varianzen (σ_1^2) für Meßfehler und andere Einflüsse beim Auswerten

bei 15 % $\frac{2,98 - 0,37}{6}$ = 0,433 → σ_1^2

Zusammenfassung der Varianzanalyse:

Es ergab sich als mittlerer Planimetrierfehler $\hat{\sigma}_o$ = 0,608 Pl.E. oder = 0,122 cm^2 und als mittlerer Fehler beim übrigen Meßvorgang $\hat{\sigma}_1$ = 0,658 Pl.E. oder = 0,132 cm^2.

b) Untersuchungen zur Methodik der Anfärbung der Pherogramme

Über einzelne Faktoren, welche die Ergebnisse der Agargelelektrophorese nach WIEME beeinflussen können, sind bereits von WIEME (102) und FRICKE (28) Untersuchungen angestellt worden. Es konnte deshalb auf diese Befunde bei der Anwendung der Methodik zurückgegriffen werden. Über ergänzende methodische Untersuchungen zur Fixation und Färbung sei nun berichtet.

Einfluß der Fixationszeit. Um nach der elektrophoretischen Auftrennung eine weitere Diffusion der Proteinmoleküle zu verhindern, werden die Pherogramme in eine Fixationsflüssigkeit gelegt. Für die eigenen Untersuchungen wurde eine Fixationszeit von 30 Minuten gewählt. Zur Prüfung der Frage, ob Veränderungen der Fixationszeiten, wie sie bei routinemäßigen Untersuchungen auftreten können, die Ergebnisse beeinflussen, wurden e

6 Pherogramme eines Hundeserums unterschiedlichen Fixationszeiten von 20, 30, 60, 120 Minuten und darüber hinaus 6 Stunden unterworfen.
Hierbei wurde festgestellt, daß schon eine Zeit von 20 Minuten für die Denaturierung ausreichend ist und Zeiten bis zu 2 Stunden, wie die quantitative Auswertung zeigt, die Ausführung nicht beeinflussen. Bei einer 6-stündigen Fixationsdauer ergibt sich gegenüber den obigen Werten beim Albumin eine Abnahme um 11 %, bei den Globulinen von 21 %.

Einfluß der Färbezeit. Alle Pherogramme wurden mit Amidoschwarz 30 Minuten gefärbt. Um den Einfluß der verschiedenen Färbedauer zu prüfen, wurden von einem normalen Hundeserum jeweils 6 Pherogramme 10, 20, 30, 120 Minuten und 6 Stunden mit Amidoschwarz gefärbt. Die Summe der Planimetereinheiten des Gesamtproteins bei der Färbezeit von 30 Minuten wurde gleich 100 % gesetzt.
Entsprechend wird bei der Färbedauer:

von 10 Minuten ein Planimeterwert von 89,9 %,
von 20 Minuten ein Planimeterwert von 93,7 %,
von 2 Stunden ein Planimeterwert von 106,2 % und
von 6 Stunden ein Planimeterwert von 95,6 %

erreicht.
Die Anfärbbarkeit bei Amidoschwarz ist zeitlich abhängig und nimmt mit zunehmender Färbedauer (bis ca. 2 Stunden) zu. Daraus muß gefolgert werden, daß die gewählte Färbezeit genau eingehalten werden muß, um bei der Auswertung reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten.

c) Albumin-Normalserumreihe

Eine Bestimmung des Albumin-Globulinverhältnisses bereitet am unverdünnten Normalserum bei der Agargelelektrophorese Schwierigkeiten, weil einerseits die durch hohe Eiweißkonzentration bedingten Farbdichten nicht sicher durch Photometer erfaßt werden können, andererseits das Lambert-Beer'sche Gesetz nicht erfüllt ist. Wir führten deshalb die Untersuchungen über die Anfärbbarkeit der

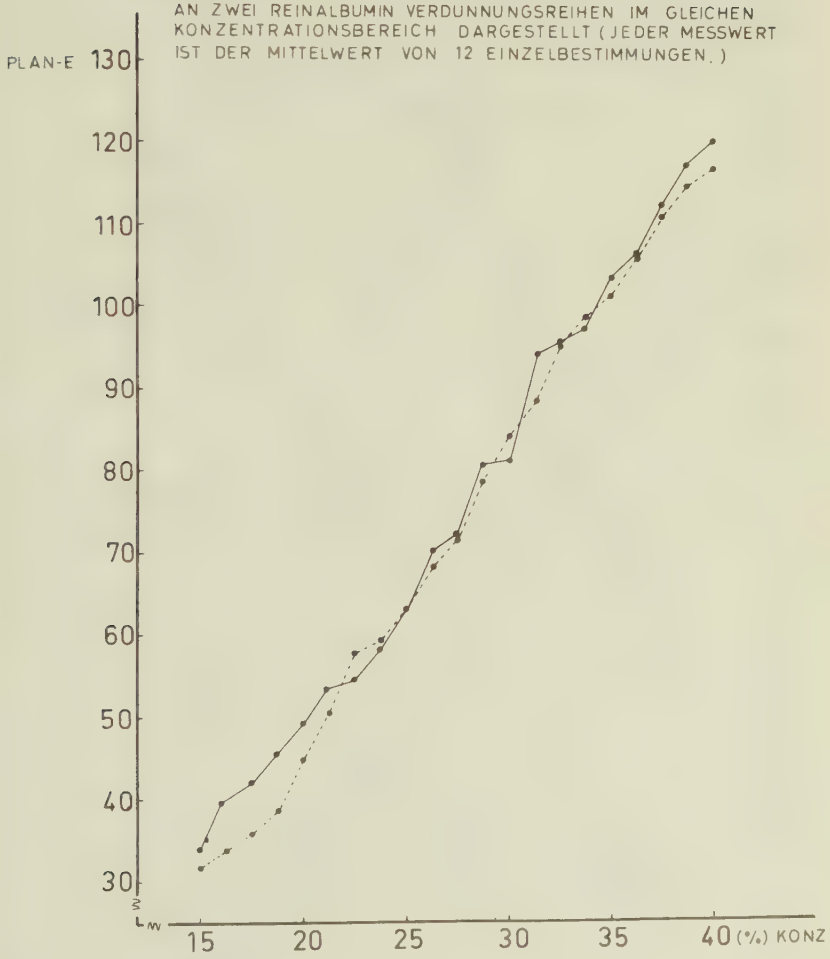
Albumine an Verdünnungsreihen von Reinalbumin und Albumin eines Mischserums durch.
Nachdem die Linearität der Meßbereiche des Photometers durch Messung von Amidoschwarz 10 B - Eichlösungen (Abb. 2) gesichert war, wurden zunächst Vorversuche zur Festlegung der Verdünnungsgrenzen mit normalem Hundeserum unternommen. Der noch erfaßbare Konzentrationsbereich der Albumine lag beim Filter 482 nm zwischen 5 und 40 %. Lagen die Konzentrationssprünge zunächst bei 10 %, so wurden sie, um die Aussagekraft der Untersuchungen zu erhöhen, auf 1,25 % herabgesetzt. Die Zahl der Pherogramme wurde zur Sicherung der statistischen Aussage auf 12 pro Konzentration festgelegt.
Für den ersten Teil der Untersuchungen verwendeten wir Rinderreinstalbumin. Eine Konzentration von 4 g wurde hierbei gleich 100 % gesetzt. Hiervon wurden 2 Verdünnungsreihen zwischen 15 % und 40 % in Konzentrationssprüngen von 1,25 % aufgestellt. Ausgedrückt in absoluten Zahlen, lag der geprüfte Konzentrationsbereich zwischen 0,6 und 1,6 g %.

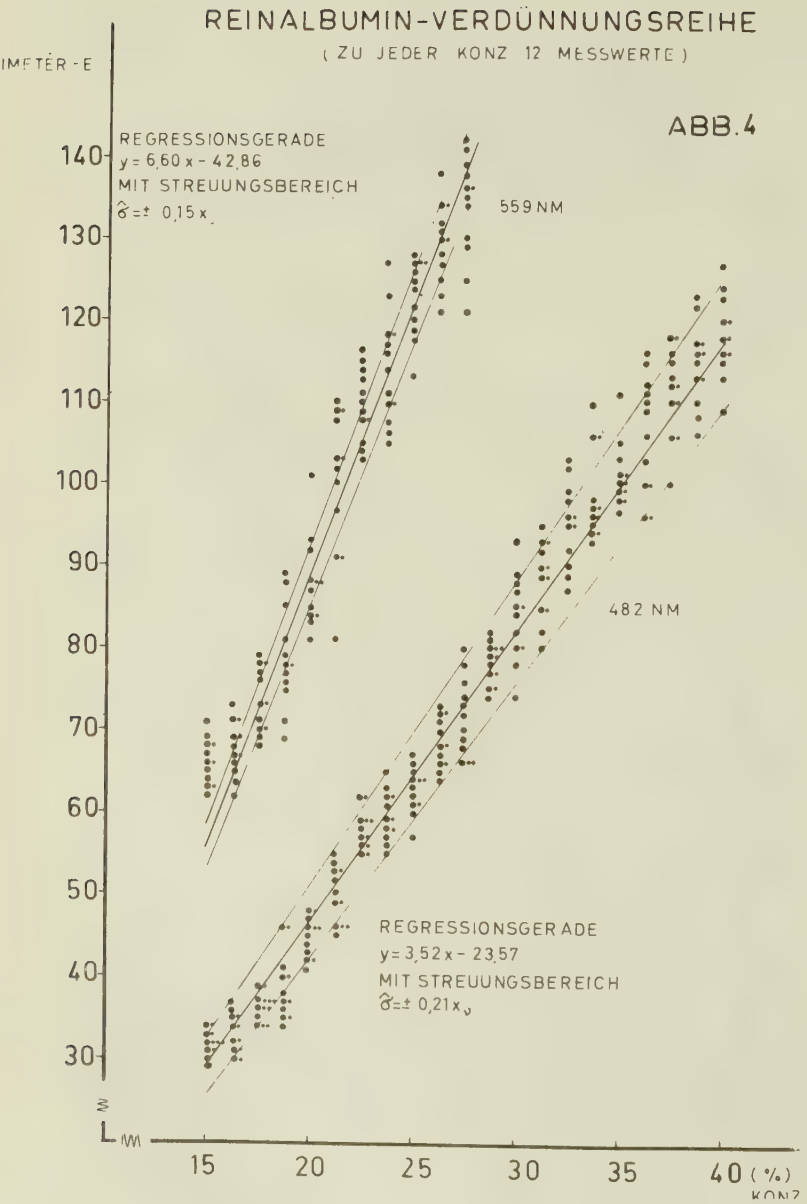
Die Resultate dieser Untersuchungen sind auf Abb. 3, 4 und 5 dargestellt. Auf Abb. 3 sind die Mittelwerte von beiden Reinalbumin-Versuchsreihen aufgezeichnet. Aus der Abbildung ist ersichtlich, daß eine gute Reproduzierbarkeit der Ergebnisse in einem Bereich von 15 - 40 % (0,6 - 1,6 g %) Albumin besteht. Auf Abb. 4 und 5 sind je Konzentration die 12 Meßwerte, sowie die aus diesen Werten berechneten Regressionsgeraden unter Angabe des Streuungsbereiches dargestellt. Die Werte der Abb. 4 sind mit dem Planimeter, die der Abb. 5 mit dem Disc. Integrator ermittelt worden. Verwendet wurden jeweils Interferenzfilter von 482 nm und 559 nm. Die Resultate wurden der Übersichtlichkeit halber mit dem Ergebnis der im folgenden zu besprechenden Serum-Albumin-Untersuchungsreihe im Abschnitt "Statistische Auswertung der Ergebnisse" ausführlich behandelt.

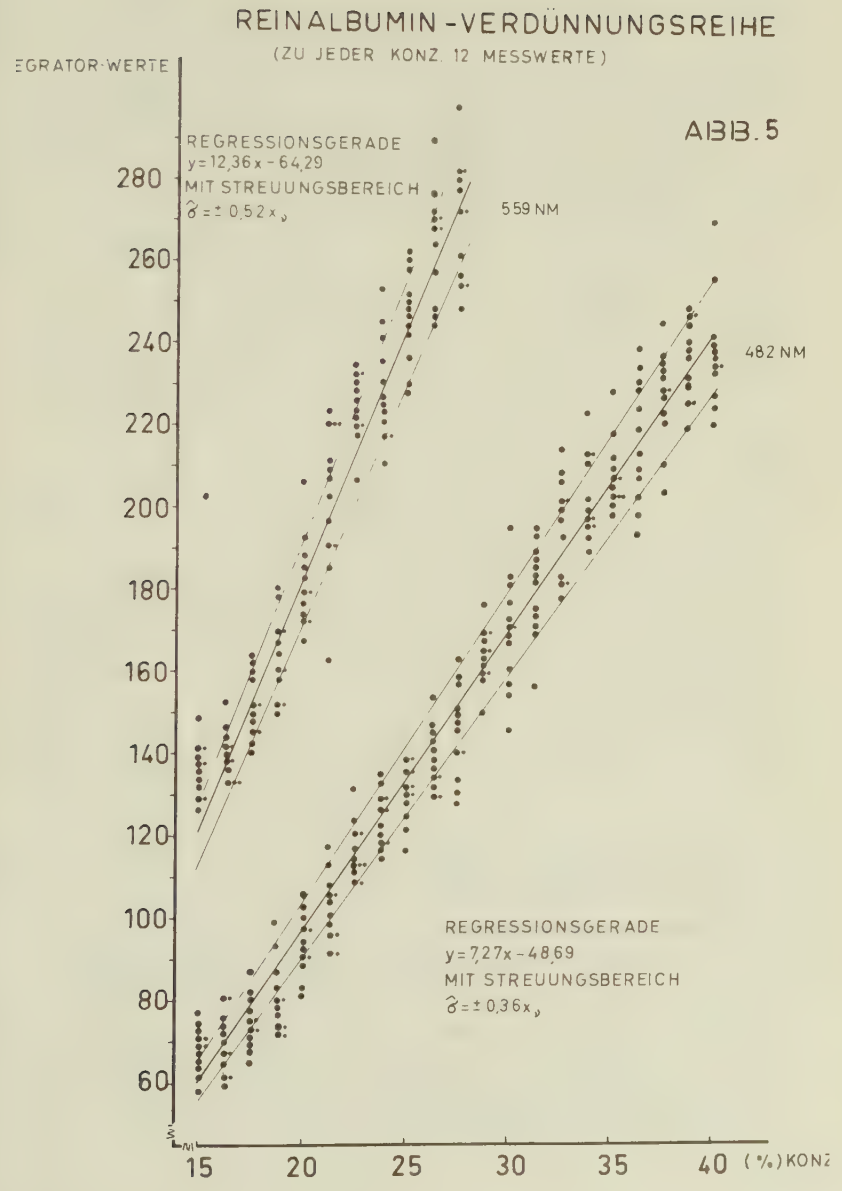
ABB. 3

REPRODUZIERBARKEIT DER AGARGEL-ELEKTROPHORESE

AN ZWEI REINALBUMIN VERDUNNUNGSREIHEN IM GLEICHEN KONZENTRATIONSBEREICH DARGESTELLT (JEDER MESSWERT IST DER MITTELWERT VON 12 EINZELBESTIMMUNGEN.)

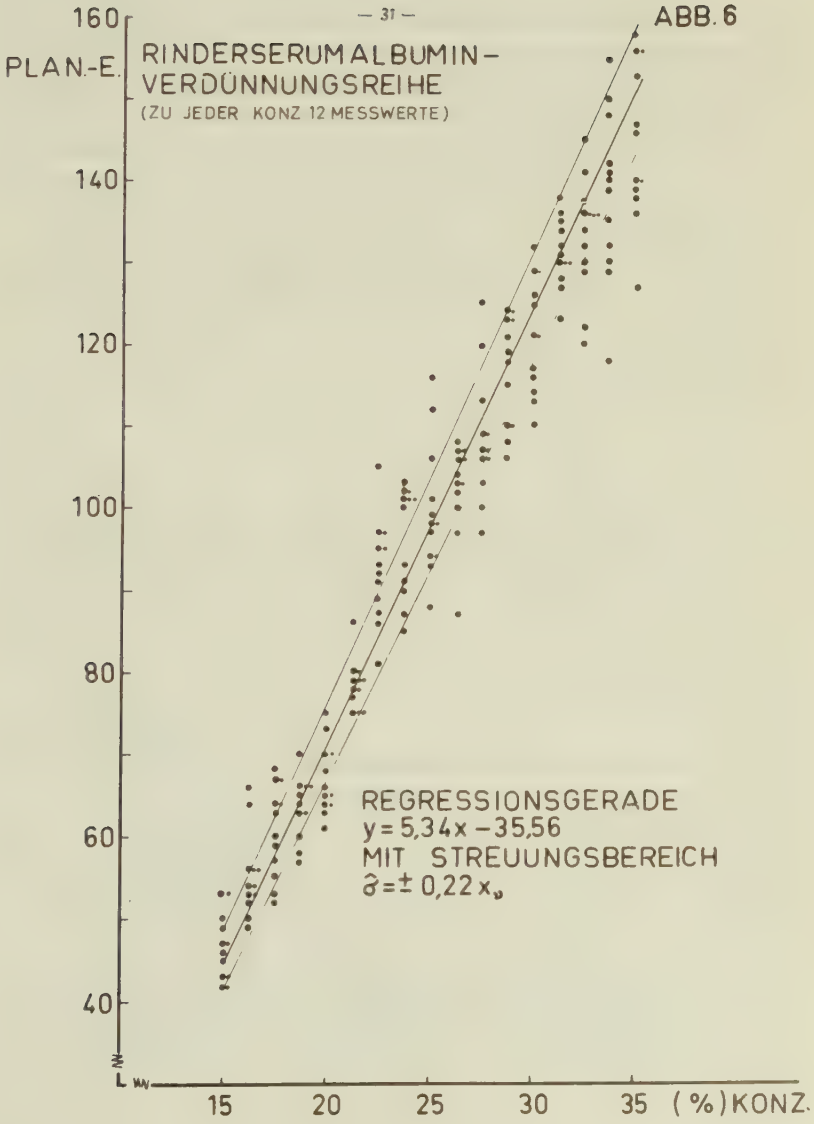



REINALBUMIN-VERDÜNNUNGSREIHE
(ZU JEDER KONZ 12 MESSWERTE)
ABB.4
IMETER-E
REGRESSIONSGERADE
y = 6,60 x - 42,86
MIT STREUUNGSBEREICH
σ̂ = ± 0,15 x
559 NM
482 NM
REGRESSIONSGERADE
y = 3,52 x - 23,57
MIT STREUUNGSBEREICH
σ̂ = ± 0,21 x
140
130
120
110
100
90
80
70
60
50
40
30
15
20
25
30
35
40 (%)
KONZ


REINALBUMIN-VERDÜNNUNGSREIHE
(ZU JEDER KONZ. 12 MESSWERTE)
EGRATOR-WERTE
ABB. 5
REGRESSIONSGERADE
y=12,36x-64,29
MIT STREUUNGSBEREICH
$\hat{\sigma}=\pm 0{,}52x_y$
559 NM
482 NM
REGRESSIONSGERADE
y=7,27x-48,69
MIT STREUUNGSBEREICH
$\hat{\sigma}=\pm 0{,}36x_y$
280
260
240
220
200
180
160
140
120
100
80
60
15
20
25
30
35
40
(%) KONZ

Eine dritte Versuchsreihe wurde an dem Serum eines gesunden Rindes unternommen und zunächst die Wanderungsgeschwindigkeit des Albumins mit der des Reinalbumins verglichen. Sie war übereinstimmend. Es wurde sodann mit Hilfe der von KEYSER (45) angegebenen Methylorangemethode versucht, das Serum so zu verdünnen, daß sein Albumingehalt entsprechend dem oben angewendeten Konzentrationsbereich zwischen 0,6 und 1,6 g % lag. Eichkurven wurden mit Rinderalbumin und unter Verwendung von Labtrol (Dade Reagents, Inc.) aufgestellt. Die Labtroleichkurve lag um etwa 2,5 g % parallel verschoben unter der mit Reinalbumin aufgestellten. Es gelang weder auf der Basis der einen noch der anderen Kurve das Rinderserum so einzustellen, daß der nach Elektrophorese einer Konzentration von 1 g % ermittelte Planimeterwert mit dem entsprechenden Wert der beiden ersten Reinalbuminversuchsreihen übereinstimmte. Die Einstellung des Albumins des Rinderserums auf den Bereich von 0,6 - 1,6 g % erfolgte deshalb empirisch nach den Planimeterwerten der Rinder-Reinalbuminreihe.
Auf Abb. 6 sind die je Konzentration erhaltenen 12 Meßwerte eingetragen. Ferner ist die aus diesen Werten berechnete Regressionsgerade mit ihrem Streuungsbereich dargestellt. Vor Beginn der Untersuchungen an dem Albumin des Rinderserums war die Frage zu klären, ob in dem Zeitraum von 8 Tagen, der für die Anfertigung von 252 Phorogrammen erforderlich war, Veränderungen in dem bei 4°C aufbewahrtem Serum auftraten. Seren von 3 gesunden Rindern wurden sofort nach der Entnahme als Kontrollen auf 1 g % Albumin eingestellt und in 9 Läufen der Elektrophorese unterworfen. Die gleichen Seren wurden in unverdünntem Zustand sowohl bei 4°C als auch gefroren aufbewahrt. Nach 4 und 8 Tagen wurden die aufgehobenen Seren ebenfalls auf 1 g % Albumin verdünnt und elektrophoretisch getrennt. Gegenüber den Kontrollwerten des 1. Tages zeigten die am 4. und 8. Tag untersuchten Seren eine Abnahme der Albuminwerte um 20 %.

ABB. 6


160
PLAN.-E.
RINDERSERUMALBUMIN-
VERDÜNNUNGSREIHE
(ZU JEDER KONZ 12 MESSWERTE)
140
120
100
80
60
40
REGRESSIONSGERADE
y = 5,34x − 35,56
MIT STREUUNGSBEREICH
$\hat{\sigma} = \pm 0{,}22\,x_y$
15
20
25
30
35
(%) KONZ.

In einer zweiten Versuchsreihe wurden wiederum Seren von 3 Rindern auf 1 g % Albumin eingestellt und mit einem Teil sofort Kontrollreihen von 9 Läufen angefertigt. Der andere Teil wurde zunächst in verdünntem Zustand bei 4°C bzw. eingefroren aufbewahrt, die Elektrophorese dann am 4. und 8. Tag durchgeführt. Es ergaben sich hierbei keine Unterschiede gegenüber den Kontrollen des 1. Tages.
Dieser Befund wurde noch einmal bei der Untersuchung der Serum-Albumin-Verdünnungsreihe überprüft. Zunächst wurden von dem Serum Verdünnungen zwischen 0,6 - 1,6 g % (15-40 %) Albumin in Konzentrationssprüngen von 1,25 g % hergestellt. Die Elektrophorese erfolgte in 2 Gruppen in einem Abstand von 4 Tagen. Sechs der zwölf für jede Konzentration anzufertigenden Pherogramme wurden sofort, die restlichen sechs nach 4-tägiger Aufbewahrung in eingefrorenem Zustand, hergestellt. Für beide Gruppen ergaben sich übereinstimmende Planimeterwerte. Das Serum wurde also durch die Aufbewahrung im verdünntem, eingefrorenem Zustand im Gegensatz zu dem unverdünntem Serum nicht beeinflußt.

Statistische Auswertung der Ergebnisse. Zunächst wurden die Meßwerte der 252 Pherogramme in ein Koordinatensystem mit der Konzentration als Abszisse und der Höhe der Planimetereinheiten als Ordinate eingetragen. Im Gegensatz zu den auf Abb. 3 eingetragenen Mittelwerten, wurden bei den Reinalbumin-Verdünnungsreihen alle 12 erhaltenen Meßwerte eingezeichnet (Abb. 4,5,6). In dem engen Konzentrationsbereich von 15 % bis 40 % (0,6 - 1,6 g % Albumin) kann die Lage des Punkteschwarms als annähernd linear bezeichnet werden. Auffällig ist das Anwachsen der Streuung mit zunehmender Konzentration. Da für die Berechnung einer linearen Regression bei gleicher Berücksichtigung aller Punkte die Voraussetzung gleicher Streuungen in den einzelnen Konzentrationen zu beachten ist, war zu prüfen, ob die erkennbaren Streuungsunterschiede zufällig oder signifikant sind. Diese notwendige Voruntersuchung wurde mit dem Bartlett-Test (E. WEBER (98), S. 185) durchgeführt und ergab in allen Fällen die Ablehnung der Hypothese

betreffs der Gleichheit der Einzelvarianzen. Die Darstellung der Varianzen bzw. der Standardabweichungen zu den einzelnen Konzentrationen ließ bei den Varianzen ein parabolisches und bei den Standardabweichungen ein lineares Anwachsen erkennen (s. Abb. 7).
Um dieser Erkenntnis bei dem Aufstellen der optimalen Regressionsgeraden gerecht zu werden, mußten die einzelnen Punkte entsprechend ihrer Streuung gewichtet werden. Nach der Maximum-Liklihood-Methode, kombiniert mit der Methode der kleinsten Quadrate waren in diesem Fall die Parameter a, b und c aus

$$L\,(x_1,x_2\ldots x_k/a,b,c) = \left(\frac{1}{\sqrt{2\pi}\,c}\right)^n \prod_{i=1}^{n} \frac{1}{x_i}\, a \; - \frac{1}{2c^2} \sum_{i=1}^{n} \sum_{j=1}^{K} \frac{(Y_{ij} - ax_i - b)^2}{x_i^2}$$

zu schätzen.

Es ergaben sich für

$$\hat{b}\ (\wedge = \text{Schätzung}) = \sum_{i=1}^{n} \frac{\bar{y}_i}{x_i^2} - \frac{\sum \frac{1}{x_i} \sum \frac{\bar{y}_i}{x_i}}{n} \Big/ \sum \frac{1}{x_i^2} - \frac{\left(\sum \frac{1}{x_i}\right)^2}{n}$$

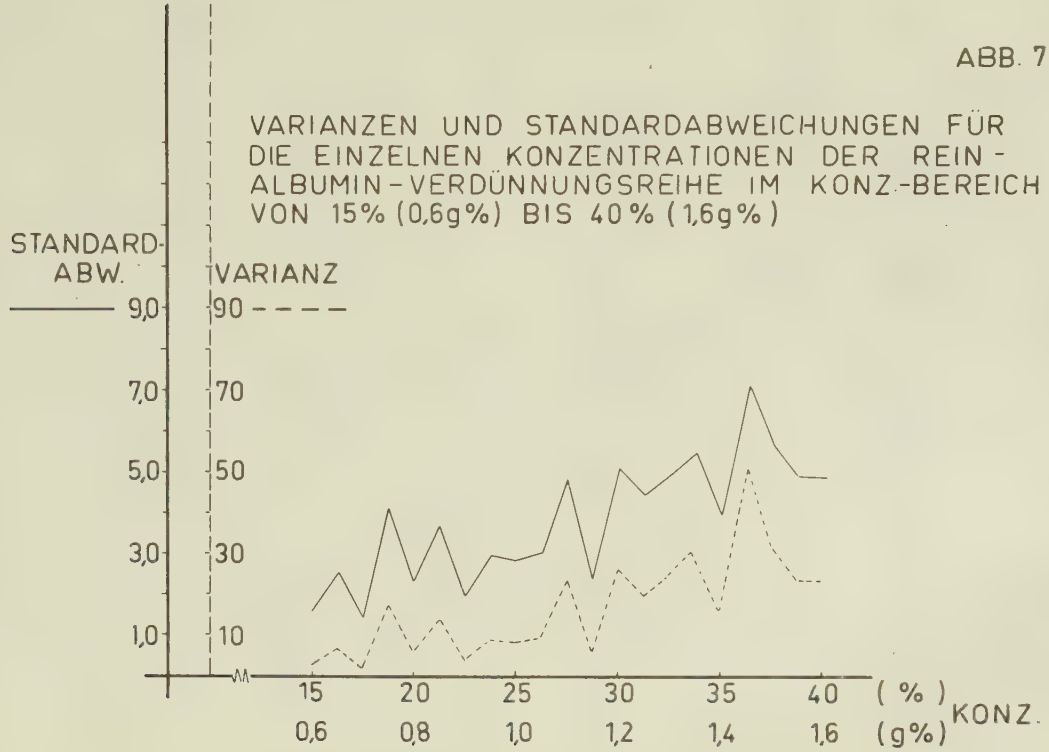
$$\hat{a} = \frac{1}{n}\sum \frac{\bar{y}_i}{x_i} - \frac{1}{n}\hat{b}\sum \frac{1}{x_i}$$

und

$$\hat{c}^2 = \frac{1}{kn-2}\left[\sum_i \sum_j \frac{\bar{y}_i^2}{x_i^2} - 2k\hat{a}\sum_i \frac{\bar{y}_i}{x_i} + nk\hat{a}^2 - 2k\hat{b}\sum_i \frac{\bar{y}_i}{x_i^2} + 2k\hat{a}\hat{b}\sum_i \frac{1}{x_i} + k\hat{b}^2 \sum_i \frac{1}{x_i^2}\right]$$

ABB. 7

VARIANZEN UND STANDARDABWEICHUNGEN FÜR DIE EINZELNEN KONZENTRATIONEN DER REIN-ALBUMIN-VERDÜNNUNGSREIHE IM KONZ.-BEREICH VON 15% (0,6g%) BIS 40% (1,6g%)



Nach der angegebenen Methode wurden die Regressionsgeraden für die Interferenzfilter 482 nm und teilweise für 559 nm berechnet und dargestellt (Abb. 4,5,6).
Zusätzlich wurde jeweils der einfache Fehlerbereich um die mittleren Regressionswerte eingetragen, der Aufschluß über den gesamten methodischen Fehler gibt. Will man anstelle der absoluten Fehler prozentuale Fehlerbereiche angeben, so ist zu berücksichtigen, daß sich diese Größen auf die mittleren Regressionswerte von bestimmten Konzentrationen beziehen.
So erhält man z.B. bei Messung mit dem Interferenzfilter 559 nm für drei verschiedene Konzentrationen die in Prozent angegebenen methodischen Fehler:

	Planimeter	Integrator
15 % (0,6 g %)	4,9 %	6,4 %
25 % (1,o g %)	3,1 %	5,3 %
40 % (1,6 g %)	2,7 %	4,8 %

D. Diskussion

Die quantitative Auswertung der freien Grenzflächenelektrophorese ist nach der Vervollkommnung der Apparatur durch TISELIUS (92) und zahlreiche Autoren heute noch eines der sichersten elektrophoretischen Trennverfahren. Nach WIEDEMANN (100), ANTWEILER (1), SCHOLTAN (84) und ESSER (16) wird ihre Genauigkeit mit ± 0,2 % bis ± 0,5 % angegeben. Ein wesentlicher Vorteil der Methode liegt vor allem darin, daß die Eiweiße zur quantitativen Analyse nicht angefärbt werden müssen und das "Trägermedium" Puffer genaue optische Analysen ermöglicht . Das Verfahren hat sich jedoch auch nach Einführung der interferometrischen Meßtechnik wegen seiner Aufwendigkeit in der Klinik nicht durchsetzen können.

Mit der Einführung des Papiers als Träger wurden störende Faktoren, welche die Entwicklung der freien Grenzflächenelektrophorese sehr behinderten, ausgeschaltet. Es tritt z.B. keine Konvektion auf, da im Papier der Puffer "fixiert" wird, auch spielt die Temperatur als Störfaktor keine wesentliche Rolle. Diesen Vorteilen steht aber eine größere Anzahl von Nachteilen gegenüber. Ihre Ursachen liegen vor allem in einer physikalischen oder chemisch bedingten Wechselwirkung zwischen Trägermedium und Proteinmolekül. Es sei in diesem Zusammenhang vor allem an den Vorgang der Adsorption der Eiweißmoleküle an den Träger und die unterschiedliche Verteilung der Proteine bzw. Farbstoffe erinnert. Bei der Papierelektrophorese wird die differierende Anfärbbarkeit verschiedener Proteine, wie die der Albumine gegenüber der der Globuline nicht berücksichtigt.

Als Bedingung für die quantitative Auswertung muß gefordert werden, daß eine lineare Beziehung zwischen Eiweißkonzentration pro mm^2 und Farbdichte besteht. HEIDE und BIEHL (40) stellten fest, daß bei der Papierelektrophorese Albumin in einer Konzentration von 0,53 γ/mm^2 vorliegt und daß die Anfärbung bis 0,6 γ/mm^2 eine lineare ist.

SIMON (89) begrenzt dagegen den Linearitätsbereich auf bis zu einer Eiweißmenge von 0,3 γ/mm^2. Nach diesem Autor ist der in höheren Konzentrationen abflachende Teil der Extinktionskurve der Albumine bei der Transparenzphotometrie auf die zu hohe Proteinkonzentration zurückzuführen. GRASSMANN und HANNIG (35) bestätigen diese Ansicht. Der hierdurch bedingte Fehler soll nach diesen Autoren jedoch durch den Faktor der erhöhten Anfärbbarkeit der Albumine gegenüber den Globulinen ausgeglichen werden.

Als weiterer störender Faktor wirkt sich bei der Transparenzphotometrie die relative Undurchsichtigkeit des Papiers auch nach Behandlung mit den die Transparenz erhöhenden Lösungen aus.

Diese oben diskutierten Faktoren bedingen die Unsicherheit für die quantitative Bestimmung der Papierelektrophorese. Nach NAUMANN und Mitarb. (61) und SIMON (89) muß bei der Anwendung der Papierelektrophorese mit einem methodischen Fehler von ± 10 bis ± 20 % gerechnet werden. Dieser Fehler ist hoch. Für die klinisch-quantitative Untersuchung hat sich die Papierelektrophorese bei Standardisierung des elektrophoretischen Trennverfahrens, der Anfärbung und der Auswertung bewährt. Als Auswertgeräte kommen vorwiegend der Extinktionsschreiber (12, 71) und das Analytrolgerät (56, 108) zur Anwendung.

In den letzten beiden Jahrzehnten haben Autoren auf der Suche nach neuen Trägern mit größerer Trennschärfe, besserem Trennungsvermögen und erhöhter Transparenz zahlreiche Medien für Zonenelektrophorese verwendet. Es kamen Celluloseazetat und Gele wie Agargel, Stärkegel, Polyacrylamid, Silicagel, ferner Cellulose, Polivinylchlorid und Polysaccharide zur Anwendung. Die letzteren eignen sich vorwiegend für die Säulenelektrophorese, auf die hier nicht eingegangen werden soll. Für klinische Zwecke haben sich Stärkegel, Polycrylamid, Celluloseazetat und Agargel bewährt. Unter Anwendung von Stärkegel gelang es SMITHIES (90) und SMITHIES und POULIK (91), SILBERMANN (88) und OLIVER mit RUBINSTEIN (62) Seren in 15 bis 20 Fraktionen aufzutrennen.

Schwierigkeiten bereitet infolge der großen Schichtdicke die quantitative Auswertung. Dieser Nachteil gilt auch für Polyacrylamid, wenn es auch wie Stärkegel infolge seines Siebeffektes bei der Elektrophorese das Serum ebenfalls in eine große Zahl von Fraktionen auftrennt (21, 23). Bedeutung erlangte in den letzten Jahren für die Klinik infolge seiner einfacheren Handhabung Celluloseazetat (8,9). Diese Substanz läßt sich transparent machen und zur kolorimetrischen Messung auflösen (50). Celluloseazetat weist gegenüber dem Agargel den Nachteil auf, daß es die Fraktionen nicht scharf trennt.

WIEME (102) kommt das Verdienst zu, die Agargelelektrophorese in eine Form gebracht zu haben, die unter bestimmten Voraussetzungen ihre Anwendung auch im klinischen Laboratorium gestattet. Schwierigkeiten bereitet die quantitative Auswertung des Albumin-Globulin-Verhältnisses, da die Farbdichte im Albuminbereich infolge der hohen Eiweißkonzentration (bei 5 g % = 3,3 γ/mm^2) und der stärkeren Anfärbbarkeit der Albumine zu intensiv ist. Dieser Wert wurde errechnet, indem die eingesetzte Albuminmenge zu der Flächenausdehnung in Beziehung gesetzt wurde.

Der Wert von 3,3 γ Eiweiß pro mm^2 liegt erheblich über dem Wert, den HEIDE und BIEHL (40) mit 0,6 γ/mm^2 als Grenzwert für den linearen Anfärbungsbereich der Eiweiße bei der Papierelektrophorese angegeben haben. Schlußfolgerungen aus dem Verhalten der Eiweiße auf dem Träger Papier hinsichtlich der Beziehung zwischen Konzentration und Anfärbbarkeit können nicht ohne weiteres auf den Träger Agar ausgedehnt werden; es liegt aber nahe, die von WIEME (102) festgestellten Schwierigkeiten bei der Erfassung des Albumin-Globulin-Verhältnisses auf die zu hohe Albuminkonzentration pro mm^2 zurückzuführen.

Mit dem für diese Arbeit verwendeten Photometer, dies gilt auch für andere Geräte, kann die Erfassung solcher hohen Albuminwerte auf dem Agar nur erreicht werden, wenn das Gerät bis zur Grenze der Leistungsfähigkeit ausgesteuert

wird. Von den Herstellern des verwendeten Gerätes wird vorgeschlagen, bei mehrmaligem Durchlauf des Phorogramms den Photostrom stufenweise zu erhöhen (95). Hierdurch wird ein Zusammensetzen der einzelnen Abschnitte der Gaußverteilung des Albumins notwendig. Dieses Verfahren birgt zahlreiche Fehlerquellen in sich. Abgesehen von dem oben geschilderten Problem der Beziehung Anfärbbarkeit-Eiweißdichte, beruhen diese Fehler einerseits auf der Unsicherheit der Messung bei voller Aussteuerung, andererseits auf der Frage, ob die einzelnen gemessenen Flächen der Gaußverteilung zusammenpassen. Eine Ermittlung dieser Fehlergröße dürfte meßtechnisch sehr schwierig sein. Es ist weiter ein wesentlich gravierenderes Argument gegen diese Art der Messung anzuführen: das Lambert-Beer'sche Gesetz ist nicht erfüllt.

Wir konnten feststellen, daß eine sichere Erfassung der Albumine bei der Methodik der Agarelektrophorese nach NIEME (102) nur bei Einsatz einer Albuminkonzentration von 0,6 bis 1,6 g % möglich ist. Das entspricht, wie festgestellt werden konnte, einer Menge von 1,1 γ bis 1,7 γ Eiweiß pro mm^2.

Der einzig sichere Weg, die hohen Albuminkonzentrationen und damit das Albumin-Globulin-Verhältnis bestimmen zu können, führt über die Verdünnung des Serums. Zur Festlegung der linearen Beziehung zwischen Eiweißkonzentration und Farbdichte wurden nach Vorversuchen am Hundeserum zwei Konzentrationsreihen von Reinalbumin und eine Reihe von Serumalbumin untersucht.

Zur graphischen Auswertung der durch die Verdünnungsreihen erhaltenen Elektrophoresediagramme stehen zwei Methoden des Integrierens zur Verfügung: die Anwendung des Disc.-Integrators und die des Planimeters.

Im folgenden sei die statistische Auswertung der Versuche diskutiert. Zunächst werden hierbei die Integrationsmethoden verglichen, sodann die Fehleranalyse beim Meßvorgang erörtert und schließlich die Meßergebnisse der Verdünnungsreihen kommentiert. Der Schwerpunkt beim Vergleich beider Methoden

lag auf ihrer Genauigkeit, um möglichst sichere Aussagen bei der quantitativen Bestimmung machen zu können. Dazu war es erforderlich, die Ergebnisse beider Verfahren - ausgedrückt in Planimetereinheiten bzw. Disc-Integratorwerten - auf den Maßstab cm^2 umzurechnen.

Bei der Gegenüberstellung der mit beiden Methoden erhaltenen Werte von 21 Konzentrationen wurde von der Hypothese ausgegangen, daß beide Verfahren zu den gleichen Ergebnissen führen. Die aufgetretenen Unterschiede sollen also noch dem Zufallsbereich ($p > 0{,}01$) angehören. Die Prüfung dieser Hypothese mit dem Mittelwerttest bei paarweiser Zuordnung der Einzelwerte zeigte jedoch, daß es sich bei den Differenzen um signifikante Unterschiede handelte. Vor allem bei den unteren Konzentrationen traten größere Unterschiede auf. Das Urteil, welchem Verfahren in Bezug auf seine Genauigkeit der Vorzug zu geben ist, kann allein aus den jeweiligen Standardabweichungen gefällt werden. Die Standardabweichungen stellen Schätzwerte für die gesamten methodischen Fehler dar. Es zeigt sich, daß die Standardabweichung bei dem Disc-Integrator größer ist als beim Planimeter.

Um Aufschluß über die Zusammensetzung des gesamten methodischen Fehlers zu erhalten, wurde versucht, seine wesentlichen Komponenten zu isolieren. Dieser Weg war beim Disc-Integrator nicht möglich, da die Integration nur während des photometrischen Meßvorganges vorgenommen werden kann. Dagegen ließ sich bei Anwendung des Planimeters der Planimetrierfehler mit Hilfe der Varianzanalyse von den sonstigen Meßfehlern trennen. So wurde z.B. bei einem Planimeterwert von 35,33 Planimetereinheiten ein mittlerer prozentualer Planimetrierfehler von 1,72 % festgestellt. Der mittlere prozentuale Fehler beim übrigen Meßvorgang - ebenfalls bezogen auf 35,33 Planimetereinheiten - ergab 1,82 %. Es darf aber nicht übersehen werden, daß es sich auch bei den mittleren Fehlergrößen um Zufallswerte handelt, die ebenfalls Schwankungen unterworfen sind.

Bei den Albuminverdünnungsreihen wurde die Untersuchung auf den Konzentrationsbereich von 0,6 bis 1,6 g % (15 bis 40 % der 4-g%-igen Stammlosung) beschränkt, da nach Vorversuchen in diesem Bereich eine annähernde lineare Beziehung zwischen Farbdichte und Eiweißkonzentration bestand. Bei der Eintragung der Einzelwerte der beiden Untersuchungsreihen in Koordinatensystemezeigt es sich, daß die Streuung des Punkteschwarms deutlich abhängig von der Konzentration war (Abb. 4, 5, 6). Bei der Berechnung der einzelnen Regressionsgeraden mußte daher das parabolische Anwachsen der Streuungen (s. Abb. 7) berücksichtigt werden.

Bezieht man die ermittelten durchschnittlichen Standardabweichungen auf die von der Konzentration abhängigen Regressionswerte, so erhält man von der Konzentration abhängige relative bzw. prozentuale Gesamtfehler. Ein als Beispiel herausgegriffener Vergleich der Reihe 559 nm zwischen Disc-Integrator - Planimeterwerten ließ erkennen, daß für beide Verfahren die prozentualen Gesamtfehler mit zunehmender Konzentration abnehmen. Dabei war der Gesamtfehler des Planimetrierverfahrens in allen untersuchten Konzentrationen kleiner als der des Disc-Integrators (s.S 35).

E. Zusammenfassung

Zur quantitativen Auswertung von Albumin im Pherogramm wurde eine Apparatur zusammengestellt, die aus einem Vitatron-Photometer mit Densitometrie-Zusatz, einem logarithmischen Voltmeter und einem Honeywellschreiber unter Anwendung besonderer Spannungsstabilisatoren besteht.

Die Schwierigkeiten der quantitativen Albuminbestimmung im Pherogramm sind zur Hauptsache in der hohen Albuminkonzentration des Serums (z.B. bei 5g% = ca. 3,3 μ/mm^2 auf dem Pherogramm) und in der stärkeren Anfärbung der Albuminfraktion gegenüber den Globulinen begründet.

Zur quantitativen Bestimmung bei der Agargelelektrophorese wurden deshalb Verdünnungsreihen von Rinderreinalbumin (BEHRING) und des Albumins eines Rinderserums untersucht, um die lineare Beziehung zwischen Extinktion und Albuminkonzentration zu ermitteln. Bei Prüfung des Rinderreinalbumins (BEHRING) wurde eine lineare Beziehung in dem Bereich von 0,6 - 1,6 g % (15-40 % der 4-g-%-igen Lösung) = 1,1 - 1,7 μ/mm^2 Albumin festgestellt; eine Linearität besteht auch bei Verwendung von Albumin des Rinderserums.

Der Fehler der Methode ist abhängig von der Albuminkonzentration; mit zunehmender Konzentration - von 0,6 - 1,6 g % (15-40%) - nimmt er prozentual ab.
Bei Anwendung der Interferenzfilter 482 nm und 559 nm beträgt der methodische Fehler, der als Mittelwert aus den Grenzwerten 0,6 und 1,6 g % bestimmt wurde, $\pm$ 4 bis $\pm$ 9 %.

Der Anwendung des automatisch registrierenden Disc-Integrators wird gegenüber dem Planimetrierverfahren in Reihenuntersuchungen der Vorzug gegeben. Das letztere Verfahren ist zwar genauer, erfordert aber wesentlich mehr Zeit und beansprucht den Untersucher stark.

Aus den Ergebnissen dieses Modellversuches ist zu entnehmen, daß eine quantitative Bestimmung des Albumins im Pherogramm durch Verdünnung des Serums in dem oben angegebenen Bereich möglich ist.

F. Literaturverzeichnis

1. ANTWEILER, H.J.:
Die quantitative Elektrophorese in der Medizin.
Springer-Verlag, Berlin - Göttingen - Heidelberg
2. Auflage (1957)

2. AUDUBERT, R., S. de MENDE:
Les principes de l'électrophorèse.
Presses Universitaires de France,
Paris (1957)

3. BAUFELD, H.:
zit. nach Dittmer, A.: Papierelektrophorese,
Grundlagen-Methodik-Klinik
VEB Gustav Fischer-Verlag, Jena 1961, 2. Auflage

4. BAUR, E.W.:
A thin layer starch-gel electrophoresis and
plastification method.
J. Lab. & Clin. Med. 61, 166 (1953)

5. BENNET, J.P.:
A continous scanning attachment for the
spectrophotometric measurement of proteins after
agar-gel electrophoresis.
Clin. Chim. Acta 63, 398 (1962)

6. BOCKEMÜLLER, W., OERTER, A.:
Die Zonenelektrophorese von Humanserum im Agargel
als interferometrisches Verfahren.
Klin. Wschr. 39, 371 (1961)

7. BRACKEN, J.S., KLOTZ, I.M.:
A simple method for the rapid determination for
serum albumin.
Amer. J. Clin. Pathol. 23, 1055 (1953)

8. BRACKENRIDGE, C.J.:
Variable dye uptake in the quantitative analysis of
abnormal globulins by cellulose acetate electrophoresis.
Analyt. Chem. 32, 1359 (1960)

9. BRACKENRIDGE, C.J., CSILLAG, E.R.:
A quantitative electrophoretic survey of serum protein fractions in health and disease.
Acta Med. Scand. 172, Suppl. 383 (1962)

10. BUSSARD, A., PERRIN, D.:
Electrophoresis in agar plates.
J. Lab. & Clin. Med. 46, 689 (1955)

11. CAWLEY, L.P., EBERHARDT, L.:
Simplified gel electrophoresis.
Amer. J. Clin. Pathol. 38, 539 (1962)

12. CONN, H., KLATSKIN, G.:
Filter paper electrophoretic patterns of serum in multiple myeloma.
Amer. J. Clin. Med. 16, 822 (1954)

13. CREMER, H.D., TISELIUS, A.:
Elektrophorese von Eiweiß in Filterpapier.
Biochem. Zschr. 320, 293 (1950)

14. CROOK, E.M., HARRIS, H., HASSAN, F., WARREN, F.L.:
Continuous direct photometry of dyed materials in filter paper with special reference to the estimations of proteins separated by electrophoresis.
Biochem. J. 56, 434 (1954)

15. CROWLEY, L.V.:
An evaluation of serum protein fractionation using a methyl orange method for determination of albumin.
Clin. Chem. 10, 1131 (1964)

16. DITTMER, A.:
Papierelektrophorese, Grundlagen - Methodik - Klinik
VEB Gustav Fischer-Verlag, Jena 1961, 2. Auflage

17. DURRUM, E.L., KOLL, J.:
A microelectrophoretic and microiontophoretic technique.
Amer. Chem. Soc. 72, 2943 (1950)

18. ESSER, H., HEINZLER, F., KAZMEIER, F., SCHOLTAN, W.:
Vergleichende Untersuchungen über die Trennung der Serumeiweißfraktionen mittels der Papierelektrophorese und der Elektrophorese-Apparatur nach TISELIUS.
Ärztl. Forschg. 6, 156 (1952)

19. FALLING, J.F., BUCKLEY, M.W., ZAK, B.:
Automatic determination of serum proteins.
Amer. J. Clin. Pathol. 33, 83 (1960)

20. FERRIS, Th.G., EASTERLING, R.E., BUDD, R.E.:
Removal of background stain by means of electric current.
Amer. J. Clin. Pathol. 38, 383 (1962)

21. FERRIS, Th.G., EASTERLING, R.E., BUDD, R.E.:
Electrophoresis of serum proteins in acrylamide gel an improved apparatus and technic for the removal of background stain, by means of an electric current.
Amer. J. Clin. Pathol. 39, 193 (1963)

22. FERRIS, Th.G., EASTERLIN, R.E., BUDD, R.E.:
Electrophoresis of serum proteins in acrylamide gel, Effect of buffers on seperation and mobiliy.
Analyt. Biochem. 8, 477 (1964)

23. FERRIS, Th.G., EASTERLING, R.E., BUDD, R.E.:
Serum protein electrophoresis in acrylamide gel, technical considerations.
Amer. J. Med. Technol. 29, 163 (1963)

24. FIELD, C.W., TEAGUE, O.:
The electrical charge of toxin and antitoxin.
J. Exper. Med. 8, 86 (1907)

25. FIELD, C.W., TEAGUE, O.:
On the electrical charge of the native proteins and the agglutinins.
J. Exper. Med. 9, 222 (1907)

26. FINE, J.M., WASZCZENKO, Z.E.:
Preparation of transparent starch gels after electrophoresis.
Nature 181, 289 (1958)

27. FRANGLEN, G.T., MARTIN, N.H.
The interaction of dyes with proteins on paper with special reference to paper electrophoresis.
Biochem. J. 57, 626 (1954)

28. FRICKE, E.:
Untersuchungen zur Methodik der Protein- und Lipoproteindarstellung des Serums gesunder Hunde mit Hilfe der Agar-Gel-Elektrophorese nach WIEME.
Vet. Med. Diss., Freie Universität Berlin 1963

29. FRIEDMAN, H.S.
A standardized procedure for serum protein electrophoresis on cellulose acetate membrane strips.
Clin. Chim. Acta 6, 775 (1961)

30. GIRI, K.V.:
A simple agar-electrophoresis apparatur and technique.
Naturwiss. 43, 232 (1956)

31. GOODWIN, J.F.:
Comparison of technics for estimation of albumin by determination of its dye-binding capacity and by paper electrophoresis.
Clin. Chim. Acta 10, 309 (1964)

32. GORDON, A., REICHARD, P.:
An electrophoretic investigation of the mixture of oligonucleotides formed by the enzymic degradation of desoxyribonuleic acid by deoxyribonuclease.
Biochem. J. 48, 569 (1951)

33. GORDON, A.H., KEIL, B., SEBESTA, K., KNESSL, O., SORM, F.:
Electrophoresis of proteins in agar jelly.
Coll. Czechoslov. Chem. Commun. 15, 1 (1950)

34. GRABAR, P., WILLIAMS, C.A.:
Méthode immuno-électrophorétique d'analyse de mélanges de substances antigéniques.
Biochim. Biophys. acta 17, 67 (1955)

35. GRASSMANN, W., HANNIG, K.:
Ein quantitatives Verfahren zur Analyse der Serumproteine durch Papierelektrophorese.
Hoppe-Seyler's Zschr. physiol. Chem.
290, 1 (1952)

36. GRASSMANN, W., HANNIG, K.:
Beiträge zur Methodik der papierelektrophoretischen Serumanalyse.
Klin. Wschr. 32, 838 (1954)

37. GRIFFITHS, L.L.:
The electrophoresis of serum and other body fluids in filter paper.
J. Lab. & Clin. Med. 41, 188 (1953)

38. GRUNBAUM, B.W., KIRK, P.L., ATCHLEY, W.A.:
Microelectrophoresis on cellulose acetate membranes.
Analyt. Chem. 32, 1361 (1960)

39. GUILLIEN, R., HERMANN, G.:
Über die Adsorption von Bromphenolblau an zellulosegebundene Serumeiweiße.
Zschr. Naturfschg. 10 b, 206 (1955)

40. HEIDE, K., BIEHL, H.:
Korrektur der bei Transparenzmessungen von Papierelektrophorese auftretenden Störungen.
Behringwerk Mitt. Heft 35, 75 (1958)

41. HENRY, R., GOLUB, O., SOBEL, Ch.:
Some of the variables involved in the fractination of serum proteins by paper electrophoresis.
Clin. Chem. 3, 49 (1957)

42. JANSEN, M.T.:
On the quantitative amidoblack B staiming of protein spots in agar gel at low local protein concentrations.
Biochim. Biophys. acta 60, 121 (1962)

43. JENCKS, W.P., JETTON, M.R., DURRUM, E.L.:
Paper electrophoresis as a quantitative method.
Biochem J. 60, 205 (1955)

44. KENDALL, J.:
Separation by the ionic migration method.
Science 67, 163 (1928)

45. KEYSER, J.W.:
Rapid estimation of albumin and total protein in small amounts of blood serum.
Clin. Chim. Acta 6, 445 (1961)

46. KNAPP, A.:
Über die Genauigkeit bei der Auswertung der Papierelektrophorese mit modernen Extinktionsschreibern.
Dtsch. Gesd. wes. 19, 359 (1964)

47. KNAPP, A., SIELER, H.:
Zur Methodik der Papierelektrophorese.
Zschr. inn. Med. 8, 741 (1953)

48. KOHN, J.:
A cellulose acetate supporting medium for zone electrophoresis.
Clin. Chim. Acta 2, 297 (1957)

49. KOHN, J.:
A micro-electrophoretic method.
Nature 181, 839 (1958)

50. KOHN, J.:
Zur Technik der Celluloseazetat-Elektrophorese.
Ärzt. Lab. 10, Heft 8/9, 223 (1964)

51. KÖRVER, G.:
Elektrophorese im Filtrierpapier, ein einfaches Verfahren zur Bestimmung der Serumeiweißkörper.
Klin. Wschr. 28, 693 (1950)

52. LATNER, A.:
Quantitative study in relation to electrophoresis of the staining of serum proteins on filter paper with naphthalene.
Biochem. J. 52, XIX (1952)

53. LAUE, D.:
Über den praktischen Wert und die Grenzen der papierelektrophoretischen Serumeiweißfraktionierung.
Der Internist 4, 521 (1963)

54. LINCKE, W.:
Die Technik der diskontinuierlichen und kontinuierlichen Elektrophorese.
GIT Heft 1, Jahrg. 8, S. 12 (1964)
Fachzschr. Laboratorium

55. LINCKE, W.:
Die Technik der diskontinuierlichen und kontinuierlichen Elektrophorese.
GIT Heft 3, Jahrg. 8, S. 122 (1964)
Fachzschr. Laboratorium

56. MACKAY, I.R.:
Quantitative filter Papierelektrophorese of Serum: Automatic scanning and integration of the dyestained strip.
J. Lab. & Clin. Med. 47, 164 (1956)

57. MACKAY, I.R., VOLWILER, W., GOLDWORTHY, P.D.:
Paper electrophoresis of serum proteins: photometric quantitation and comparison with free electrophoresis.
J. Clin. Invest. 33, 855 (1954)

58. MATTENHEIMER, H.:
Mikromethoden für das klinisch-chemische und biochemische Laboratorium.
Verlag de Gruyter & Co., Berlin 1961

59. MICHAELIS, L.
Zit. nach TISELIUS, A.
Elektrophorese.
Med. Prisma (Boehringer) 5, 5 (1962)

60. MÜLLER, J.:
Die Vergleichbarkeit papierelektrophoretischer Werte aus Geräten verschiedener Hersteller.
Zschr. inn Med. 10 (1963)

61. NAUMANN, G., WILDE, J., KÜHN, O.:
Zur Frage der Reproduzierbarkeit papierelektrophoretischer Meßergebnisse.
Zschr. inn. Med. 13, 180 (1958)

62. OLIVER, I.T., RUBINSTEIN, H.J.:
Studies on macroglobulins by starch gel electrophoresis and ultra centrifugation.
Clin. Chim. Acta 7, 63 (1962)

63. OTT, H.:
Electrophoretic separation of serum proteins on acrylamide gel.
med. Welt 51, 2697 (1960)

64. OWEN, J.A.:
Gravimetric method of measuring the protein fractions.
Analyst 81, 26 (1956)

65. PALETTA, B.:
Verzerrungsfreie Zonenelektrophorese im Stärkegel.
Clin. Chim. Acta 5/4, 490 (1960)

66. PEZOLD, F.A.:
Kritische Bemerkungen zur Anwendung der Papierelektrophorese in der ärztlichen Diagnostik.
Ärztl. Wschr. 13, 129 (1958)

67. PEZOLD, F.A., KOFES, A.:
Beitrag zur Photometrie gefärbter Filtrierpapierstreifen mittels des Transparenzverfahrens.
Klin. Wschr. 32, 504 (1954)

68. PEZOLD, F.A., PEISER, U.:
Untersuchungen über die Affinität papierelektrophoretisch aufgetrennter und denaturierter Serumproteinfraktionen gegenüber den Eiweißfarbstoffen Amidoschwarz, Azokarmin und Bromphenolblau.
Klin. Wschr. 31, 982 (1953)

69. PEZOLD, F.A., THOMAS, H.:
Elektrophoretische Untersuchungen von Humanseren und isolierten Proteinfraktionen mittels einer standardisierten Agar-Technik.
Zschr. exp. Med. 129, 412 (1957)

70. PHILPOT, G.R.:
The standardisation of methyl orange albumin methods.
Clin. Chim. Acta 10, 479 (1964)

71. PIEPER, J.:
Beiträge zur quantitativen Auswertung von Papier-Elektrophoresegrammen.
Klin. Wschr. 36, 605 (1958)

72. PLÜCKTHUN und GÖTTING:
Beitrag zur Methode der elektrophoretischen Untersuchung der Serumeiweißkörper auf Filtrierpapier.
Klin. Wschr. 29, 415 (1951)

73. POULIK, M.D., SMITHIES, O.:
Comparison of the starch gel and filter paper electrophoretic methods applied to human sera: two dimensional electrophoresis.
Biochem. J. 68, 636 (1958)

74. PUCAR, Z.:
Über die Färbung der Papierelektrophoresediagramme mit Amidoschwarz.
Hopp.-Seyler's Zschr. physiol. Chem. 296, 62 (1954)

75. RAULN, H.M.:
Biochem. Taschenbuch,
1956, Springer-Verlag Berlin

76. RAYMOND, S., WANG, Yi. Ju.:
Preparation and properties of acrylamide gel for use in electrophoresis.
Anal. Biochem. 1, 399 (1960)

77. RAYMOND, S., WEINTRAUB, L.:
Acrylamide gel as a supporting medium for zone electrophoresis.
Science 1304, 711 (1959)

78. RIBEIRO, L.P., MITIDIERI, E., AFFONSO, O.R.:
Paper electrophoresis. A review of metnode and results.
Elsevier Publishing Comp., Amsterdam 1961

79. RIVA, G., MARTINI, V.:
Erfahrungen mit der Papierelektrophorese.
Schweiz. med. Wschr. 83, 73 (1953)

80. RUBINSTEIN, H.J., OWEN, J.A., LARSEN, W.:
Measurement of proteins separated by electrophoresis in starch gel.
Clin. Chim. Acta 5, 583 (1960)

81. SAMMONS, H.G., WHITEHEAD, P.H.:
A method of quantitative serum protein electrophoresis.
Clin. Chim. Acta 8, 673 (1963)

82. SCHEIDEGGER, J.J.:
Une micro-méthode de l'immuno-électrophorèse.
Int. Arch. Allergy 7, 103 (1955)

83. SCHEURLEN, P.G.:
Beitrag zur Auswertung der Papierelektrophoresestreifen mit Integrationsgeräten.
Klin. Wschr. 35, 485 (1957)

84. SCHOLTAN, W.:
Vergleichende Untersuchungen zur Bewertung der neueren Methoden oder Eiweißbestimmung in Serum und Plasma.
Ärztl. Forschg. I 6, 145 (1952)

85. SCHULTZE, H.E., GÖLLNER, I., HEIDE, K., SCHÖNBERGER, M., SCHWICK, G.:
Zur Kenntnis der α-Globuline des menschlichen Normalserums.
Naturfschg. 10 b, 463 (1955)

86. SCHULTZE, H.E.:
Neuere Erkenntnisse über die Chemie der Plasmaeiweißkörper.
Ärztl. Labor. 1, 81 (1955)

87. SCHULZ, D.M., HOLDCRAFT, M.T.:
An evaluation of photometric quantitation in analysis of serum protein by paper electrophoresis.
Amer. J. Clin. Pathol. 26, 215 (1956)

88. SILBERMAN, H.J.:
Multipel myelomatosis and macro-globulinaemie, differentiation by starch gel electrophoresis.
Lancet 26, 273 (1957)

89. SIMON, K.:
Fehlerquellen der Papierelektrophorese.
Zschr. inn. Med. 12, 113 (1957)

90. SMITHIES, O.:
Zone electrophoresis in starch gels:
Group Variations in the serum proteins of normal human adults.
Biochem. J. 61, 629 (1955)

91. SMITHIES, O., POULIK, M.D.:
Two-dimensional electrophoresis of serum proteins.
Nature 177, 1033 (1956)

92. TISELIUS, A.:
Elektrophorese.
Med. Prisma (Boehringer) 2, 5 (1962)

93. TURBA, F., ENENKEL, A.J.:
Elektrophorese von Proteinen in Filtrierpapier.
Naturwiss. 37, 93 (1950)

94. VAHVASELKÄ, E.:
A method for quantitative starch-gel electrophoresis.
Nature 193, 474 (1962)

95. VITATRON
Arbeitsanleitung Vitatron UFD
Vitatron, Amsterdam

96. WALSH, J.R., HUMOLDER, F.L., DUNN, A.L.:
Comparative studies in quantitative filter paper electrophoresis.
J. Lab. & Clin. Med. 46, 772 (1955)

97. WATSON, D., NANKIVILLE, D.D.:
Determination of plasma albumin by dyebinding and other methods.
Clin. Chim. Acta 9, 359 (1964)

98. WEBER, E.:
Grundriß der biologischen Statistik.
VEB Gustav Fischer-Verlag, Jena, 1964, 5. Auflage

99. WENZEL, M.:
Welche Methode der Pherogrammauswertung ist für die Praxis, auch bei Berücksichtigung wirtschaftlicher Gesichtspunkte am vorteilhaftesten.
Dtsch. Gesd. wes. 10, 1345 (1955)

100. WIEDEMANN, E.:
Über die moderne Untersuchungstechnik biologischer Flussigkeiten und Präparate mittels der klassischen Elektrophorese und der Ultrazentrifuge.
Clin. Chim. Acta 4, 6 (1959)

101. WIELAND, T., WIRTH, L.:
Retentionsanalyse von Papierelektropherogrammen natürlicher Proteingemische.
Angew. Chem. 62, 473 (1950)

102. WIEME, R.J.:
Studies on agar-gel electrophoresis.
Techniques - Applications.
Arscia Uitgaven N.V., Brüssel (1959)

103. WIEME, R.J.:
Über einige Aspekte der Elektrophorese im Agar-Gel.
Behringwerk-Mitt. 34, 27 (1958)

104. WIEME, R.J., RABACY, M.:
A new technique of quantitative ultramicroelectrophoresis.
Naturwiss. 44, 112 (1957)

105. WUNDERLY, Ch.:
Die Papierelektrophorese.
Verlag H. R. Sauerländer & Co., Aarau und
Frankfurt a.M., 2. Auflage (1959)

106. WUNDERLY, Ch.:
Controls for electrophoresis in agar-jelly.
Clin. Chim. Acta 3, 298 (1958)

107. WUNDERLY, Ch.; BUSTAMANTE, V.:
Die Proteinanalyse des schweizerischen Standard Trockenserum.
Clin. Chim. Acta 3, 92 (1958)

108. WUNDERLY, Ch., BUSTAMANTE, V.:
Eine verbesserte Technik der Elektrophorese in Agargel.
Klin. Wschr. 35, 758 (1957)

109. YEOMAN, W.B.:
A study of paper protein electrophoresis with special reference to a new method of subfractionation.
Clin. Chim. Acta 4, 523 (1959)

110. ZAK, B., SUN, K.H.
Technic for separation of protein by means of agar gel electrophoresis.
Amer. J. Clin. Pathol. 29, 69 (1958)

Herrn Professor Dr. Dr. Dr. G. Schützler möchte ich an dieser Stelle für die Überlassung des Themas und die gern gewährten Ratschläge herzlich danken.

Mein Dank gilt auch Herrn Dr. M. Siegert, Akademischer Rat am Institut für Veterinär-Pharmakologie, Abteilung für Experimentelle Therapie und Funktionelle Pathologie, für die Unterstützung bei der Durchführung der Versuche. Allen anderen Mitarbeitern des Instituts statte ich ebenfalls meinen Dank ab.

Herrn Dipl. Kaufmann H. Weiss danke ich für die Beratung in statistischen Fragen.

Lebenslauf

Am 22.11.1938 wurde ich als Sohn des Landwirts Friedrich Schulze und seiner Ehefrau Amanda, geborene Wolter, in Frankenfelde/Luckenwalde geboren.

Nach sechsjähriger Volksschulzeit in Frankenfelde besuchte ich die Gerhart-Hauptmann-Oberschule in Luckenwalde bis zum Abitur 1956.
Vom Sommer 1956 bis zum Herbst 1957 arbeitete ich in der elterlichen Landwirtschaft.
Ein Ergänzungslehrgang von Herbst 1957 bis zum Juni 1958 folgte an der Leibniz Schule in Berlin-Kreuzberg.

Danach studierte ich 9 Semester Veterinärmedizin an der Freien Universität Berlin.
Mein Staatsexamen bestand ich am 5.12.1963.

Seit Dezember 1963 bin ich Doktorand im Institut für Veterinär-Pharmakologie, Abteilung für Experimentelle Therapie und Funktionelle Pathologie der Freien Universität Berlin.